

ФГБНУ «Федеральный Исследовательский Центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН»

на правах рукописи

Щербань Андрей Борисович
ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ
АЛЛОПОЛИПЛОИДНЫХ ГЕНОМОВ ЗЛАКОВ

Генетика – 03.02.07.

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор Салина Е.А.

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Аллополиплоидизация- основной фактор эволюции высших растений.....	16
1.1.1. Распространенность полиплоидов среди покрытосеменных растений.....	19
1.1.2. Репродуктивные барьеры в ходе формирования аллополиплоидов.....	23
1.1.3. Самосовместимость как механизм воспроизводства аллополиплоидов на ранних стадиях.....	30
1.1.4. Искусственно-синтезированные аллополиплоиды.....	33
1.2. Структурно-функциональная организация генома высших растений.....	36
1.2.1. Молекулярная организация генома высших растений	37
1.2.2. Хромосомная организация генома высших растений	55
1.3. Генетические и эпигенетические изменения у аллополиплоидов.....	63
1.3.1. Хромосомные перестройки.....	65
1.3.2. Структурная дивергенция субгеномов.....	70
1.3.3. Генетические изменения, связанные с мобильными элементами.....	72
1.3.4. Эпигенетические изменения.....	77
1.3.5. Изменения экспрессии и структурно-функциональная дивергенция гомеологичных генов.....	85
1.4. Генетический контроль продолжительности вегетационного периода у диплоидных и полиплоидных видов высших растений.....	90
1.4.1. Генетический контроль времени цветения у <i>A. thaliana</i>	91
1.4.2. Генетический контроль времени цветения у злаков.....	95
1.4.3. Гомеологичные гены <i>VRN-1</i> у мягкой пшеницы.....	101
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	107
2.1. Растительный материал.....	107
2.2. Нуклеотидные последовательности, ДНК-зонды и праймеры.....	109
2.3. Выделение ДНК растений.....	113
2.4. Выделение ДНК плазмид и ВАС-клонов.....	113
2.5. Полимеразная цепная реакция.....	114
2.6. RAPD-анализ.....	115
2.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле. Выделение ПЦР- продуктов из геля.....	115
2.8. Блот-гибридизация по Саузерну и gCAPS метод.....	116

2.9. Анализ метилирования рДНК.....	117
2.10. Клонирование ПЦР-фрагментов.....	118
2.10.1. Очистка ПЦР-фрагментов и лигирование.....	118
2.10.2. Получение электрокомпетентных клеток и трансформация клеток <i>E.coli</i> рекомбинантной ДНК.....	118
2.11. Анализ первичной структуры ДНК.....	119
2.12. Субклонирование и анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК ВАС-клона	120
2.13. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	121
2.14. Выделение РНК растений и обратная транскрипция.....	123
2.15. Количественная ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции.....	123
2.16 Оценка времени колошения	124
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	126
3.1. Последовательность <i>gypsy</i> - ретротранспозона в качестве маркера ди- и полиплоидных геномов комплекса риса <i>O.officinalis</i>	126
3.1.1. Выделение и анализ структурной организации последовательности <i>gypsy</i> -ретротранспозона <i>rhoe 49</i>	126
3.1.2. Анализ полиморфизма интегразного домена <i>gypsy</i> -ретроэлементов среди ди- и полиплоидных видов комплекса <i>O. officinalis</i>	131
3.2. Анализ геном- специфичного ретроэлемента в составе D- генома мягкой пшеницы.....	135
3.2.1. Субклонирование и анализ первичной структуры D- геном специфичного клона ВАС_112D20.....	137
3.2.2. <i>Gypsy</i> - подобный ретротранспозон <i>Lila</i> как специфический маркер D-субгенома.....	139
3.3. Анализ ранних геномных изменения в ходе аллополиплоидизации с использованием модели синтетических амфиплоидов <i>Triticum</i> x <i>Aegilops</i>	142
3.3.1. Геномные изменения на ранних стадиях образования амфиплоида <i>Ae.longissima</i> x <i>T.urartu</i>	142
3.3.2. Анализ генетических и эпигенетических изменений генов 45S рРНК у амфиплоида <i>Ae. sharonensis</i> x <i>Ae. umbellulata</i>	148
3.3.3. Анализ изменений 5S рДНК у синтетических амфиплоидов.....	155
3.4. Структурно-функциональная дивергенция гомеологичных генов <i>VRN-1</i> в ходе формирования геномов полиплоидных пшениц.....	163
3.4.1. Анализ первичной структуры и экспрессии различных <i>VRN-B1</i> аллелей в составе изогенных линий мягкой пшеницы, отличающихся по времени колошения.....	164
3.4.2. Анализ аллельного разнообразия <i>VRN-1</i> и <i>Ppd-D1</i> генов в различных сортах мягкой пшеницы; ассоциация <i>VRN-1</i> генотипа со сроком колошения.....	168

3.4.3. Анализ аллельного разнообразия <i>VRN-1</i> генов в составе ранних форм полиплоидных пшениц и их диплоидных предков.....	172
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	193
4.1. Роль мобильных элементов класса LTR- ретротранспозонов в эволюции полиплоидных геномов злаков.....	193
4.1.1 Изучение дивергенции распространенного ретроэлемента у ди- и полиплоидных представителей комплекса <i>O. officinalis</i>	194
4.1.2 Организация и эволюция геном- специфических LTR ретроэлементов в составе поли- плоидных форм пшеницы.....	198
4.2 Ранние геномные изменения у искусственных амфиплоидов <i>Triticum x Aegilops</i>	206
4.2.1. Локальные геномные изменения в составе синтетического аллополиплоида <i>Ae. longissima x T. urartu</i>	206
4.2.2. Изменения генов 45S и 5S рРНК в составе синтетических амфиплоидов пшеницы.....	210
4.3. <i>VRN-1</i> гены пшеницы как модель эволюционных изменений гомеологичных генов в ходе аллополиплоидизации.....	221
4.3.1. Влияние структурных изменений регуляторных районов <i>VRN-B1</i> гена на его экспрессию и время колошения.....	222
4.3.2. Разнообразии <i>VRN-1</i> гаплотипов, определяющих яровой образ жизни у гексаплоидной пшеницы.....	227
4.3.3. Ассоциированные с геном <i>VRN-1</i> предпосылки ярового образа жизни у тетраплоидных пшениц и их диплоидных предшественников.....	237
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	251
ВЫВОДЫ.....	253
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	255
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	312-335

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТФ- аденозинтрифосфорная кислота
- Бз1- сорт Безостая 1 *T. aestivum*
- ГИ- геномный импринтинг
- дНТФ- дезоксинуклеозидтрифосфаты
- МЭ- мобильные генетические элементы
- ОРС- открытая рамка считывания
- пн - пара нуклеотидов; тпн- тысяча пар нуклеотидов; мпн- миллион пар нуклеотидов
- ОТ- обратная транскрипция
- ПП ДНК- повторяющиеся последовательности ДНК
- ПЦР- полимеразная цепная реакция
- рРНК- рибосомальная РНК; рДНК- рибосомальная ДНК
- С29- сорт Саратовская 29 *T. aestivum*
- ФАО- Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (Food and Agricultural Organisation; FAO)
- ЦМС- цитоплазматическая мужская стерильность
- 45S рДНК- семейство генов, кодирующих рРНК с коэффициентом седиментации 45S
- 5S рДНК- семейство генов, кодирующих рРНК с коэффициентом седиментации 5S
- AFLP- полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (amplified fragments lengths polymorphism)
- ВАС- искусственная бактериальная хромосома (bacterial artificial chromosome)
- СArG-бок- участок промотора *VRN-1* гена, предположительно связывающий белок- супрессор
- CO- ген интегратор циркадных ритмов и фотопериода у *Arabidopsis thaliana* (*CONSTANS*)
- CS- сорт Чайниз Спринг *T. aestivum*
- Dm- сорт Диамант *T. aestivum*
- EST- экспрессирующиеся последовательности ДНК (expressed sequences tags)
- ETS- внешняя транскрибируемая спейсерная последовательность (external transcribed spacer sequence)
- FISH- флуоресцентная *in situ* гибридизация
- FLC*- ген репрессор цветения у *Arabidopsis thaliana* (Flowering Locus C)
- FT*- ген интегратор цветения у *Arabidopsis thaliana* (Flowering Locus T)
- F₁- гибрид первого поколения
- F₂, F₃, F₄- второе, третье, четвертое поколения от самоопыления F₁
- ГА- гиббереллины
- gCAPS (CAPS)- расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности геномной ДНК (genomic cleaved amplified polymorphic sequences)
- GISH- геномная *in situ* гибридизация

INT- интеграна (integrase)

ISBP- маркеры на основе сайтов инсерций мобильных элементов (Insertion site-based polymorphism)

LINE- длинные диспергированные элементы (long interspersed elements)

LTR- длинные терминальные повторы

miRNA- микро РНК

MITE- миниатюрный транспозон (miniature transposon elements)

NIL- почти-изогенная линия (near isogenic line)

NOR- ядрышковый организатор (nucleolar organizer region)

Ph1- ген пшеницы, контролирующий спаривание гомеологичных хромосом

PPD-1- ген ответа на фотопериод у злаков

PR2- комплекс белков, осуществляющий метилирование гистона H1 (репрессирующий комплекс)

QTL- локусы количественных признаков (quantitative traits loci)

RAPD- случайно амплифицированная полиморфная ДНК (random amplified polymorphic DNA)

RFLP- полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (restriction fragments lengths polymorphism)

RT- обратная транскриптаза (reverse transcriptase)

SINE- короткие диспергированные элементы (short interspersed elements)

siRNA- малая интерферирующая РНК (small interfering RNA)

SNP- однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)

SSAP- полиморфизм амплифицированных специфичных последовательностей (sequence-specific amplified polymorphism)

SSR- простые повторяющиеся последовательности (simple sequence repeats)

S₁-S₃- самоопыленные поколения экспериментально полученных амфиплоидов

TIR- концевой инвертированный повтор (terminal inverted repeats)

TIS- сайт инициации транскрипции (transcription initiation site)

TSD- дупликация сайта мишени (target site duplication)

VRN-box- участок промотора *VRN-1* гена, содержащий предполагаемый сайт связывания с РНК- полимеразой II

VRN-1- центральный ген цветения, контролирующий реакцию на яровизацию у злаков

VRN-2- ген- аналог (не ортолог) *FLC*- гена; супрессор цветения у злаков

VRN-3- ген интегратор цветения у злаков; аналог *FT*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Семейство злаки (Poaceae) включает в себя большинство хозяйственно-ценных видов растений, особое место среди которых занимают хлебные зерновые культуры, такие как пшеница, рожь, рис, кукуруза, овес, ячмень, сорго, просо и другие. Эта группа возделываемых растений является наиболее значимой в хозяйственной деятельности человека в качестве источника зерна- основного продукта его питания, как важные кормовые культуры и как сырье для различных отраслей промышленности. Согласно данным ФАО (<http://www.fao.org>) за 2016 год в структуре валового мирового производства зерна первое место занимает кукуруза- 40%, второе- пшеница (29%), третье- рис (19%). В России по данному показателю лидирует пшеница (60%), на долю кукурузы и риса приходится 13% и 1% валового сбора зерна, соответственно (<http://www.ab-centre.ru>; данные за 2015 год).

Подавляющее большинство зерновых культур- аллополиплоиды, возникшие в результате объединения на разных стадиях эволюции двух и более геномов в одном ядре. Первой зерновой культурой, геном которой был полностью расшифрован, является рис, *Oryza sativa* L.,- палеополиплоид, имеющий сравнительно небольшой геном- 0.38×10^9 пн (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Геном другой важнейшей зерновой культуры- мягкой, или гексаплоидной пшеницы, *Triticum aestivum* L. (BBAADD, $2n=6x=42$) составляет 17.3×10^9 пн, что ~в 43 раза превышает геном риса (Brenchley et al., 2012). Данный геном возник в результате двух раундов аллополиплоидизации: 1) 0.5-3 млн лет назад в результате скрещивания предковых диплоидных видов *T. urartu* Thum. (AA; $2n=14$) и *Ae. speltoides* Tausch. (BB; $2n=14$) возник аллотетраплоид *T. dicoccoides* Thell. (BBAA; $2n=28$); 2) 8 000 лет назад в результате скрещивания тетраплоида *T. dicocum* Schrank. (BBAA; $2n=28$) и *Ae. tauschii* Coss. (DD; $2n=14$) возник предок гексаплоидной пшеницы (Blake et al., 1999;

Huang et al., 2002; Dvorak et al., 2006). Недавно Международным консорциумом по секвенированию генома пшеницы (International Wheat Genome Sequence Consortium - IWGSC; <http://www.wheatgenome.org>) было практически завершено секвенирование генома мягкой пшеницы. Однако, в этом, а также в других случаях, важно не только получить полную первичную структуру геномной ДНК, но и понять механизмы функционирования, а также закономерности формирования столь сложной генетической системы, что является гораздо более длительной и трудоемкой задачей.

В большинстве случаев образование аллополиплоида может происходить либо в результате гибридизации между двумя диплоидными родительскими видами с последующим удвоением хромосом в соматических клетках гибрида, либо в результате слияния нередуцированных мужских и женских гамет диплоидных видов (Chen and Ni, 2006). После этого в процессе формирования аллополиплоида можно условно выделить две стадии (Feldman and Levi, 2009). На ранней стадии преимущественным направлением является предотвращение спаривания гомеологичных хромосом (парных хромосом родительских видов) в ходе мейоза, которое значительно снижает фертильность полиплоида и приводит к разного рода хромосомным аномалиям. Правильное расхождение хромосом в случае мягкой пшеницы обеспечивается функционированием *Ph1* локуса (Griffiths et al., 2006), а также механизмами быстрой реорганизации гомеологичных хромосом (Ozkan and Feldman, 2009). На последующей, более длительной стадии эволюции аллополиплоидного генома происходит постепенный переход от полиплоидного состояния к диплоидному (диплоидизация), связанный с редукцией избыточного генетического материала и структурно-функциональной дивергенцией генов-гомеологов в сторону их суб- или неофункционализации (Feldman and Levi, 2009; Chaudhary et al., 2009). Так, у мягкой пшеницы произошла редукция приблизительно 10-16 тыс. генов, по сравнению с суммарным набором генов диплоидных предшественников

(Brenchley et al., 2012). Наряду с этим, большинство регуляторных генов, относящихся к транскрипционным факторам, сохранили свою структурно-функциональную организацию в субгеномах мягкой пшеницы (Brenchley et al., 2012). Это указывает на поддержание генных сетей внутри отдельных субгеномов и их вклад в неаддитивную экспрессию генов и генетическую пластичность, характерные для аллополиплоидного генома.

Выяснение механизмов реорганизации аллополиплоидного генома связано с исследованием эволюции отдельных структурно-функциональных компонентов растительного генома в ходе процесса аллополиплоидизации. В первых работах анализ структуры генома проводился с использованием метода оценки скорости реассоциации ДНК (Britten and Kohne, 1968). Были выделены различные классы ДНК, различающиеся по скорости реассоциации и, следовательно, по степени повторности:

1) Повторяющиеся последовательности ДНК (ПП ДНК), составляющие 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 терминальные 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 некодирующих ПП ДНК- сателлитная ДНК, представленная тандемными повторами различной длины, которые расположены в виде кластеров- крупных скоплений, образующих гетерохроматиновые блоки хромосом (Heslop-Harrison, 2000). Часть ПП ДНК может кодировать продукты, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма на всех стадиях его жизненного цикла, как, например, гены, кодирующие компоненты белок-синтезирующего аппарата: рибосомальную РНК (рРНК), транспортную РНК (тРНК) и др.

2) Уникальные или низкокопийные кодирующие последовательности ДНК, а также непосредственно связанные с ними регуляторные элементы. Составляют наименьшую часть растительного генома- 1-5% (Schmidt, Neslop-Harrison, 1998). Среди них можно выделить общие гены, или гены «домашнего хозяйства», включающие также предыдущие кодирующие ПП ДНК. Другая обширная группа- специализированные гены, контролирующие специфические функции клеток тех или иных тканей. Особая роль среди последних принадлежит транскрипционным факторам, инициирующим переход к различным стадиям жизненного цикла растения.

Ген *VRN-1* у злаков кодирует транскрипционный фактор, контролирующий важнейший физиологический признак- реакцию на яровизацию (воздействие низкой температурой для индукции колошения) и переход клеток апикальной меристемы стебля в клетки генеративных тканей (Murai et al., 2003; Yan et al. 2003). Все три гомеологичные копии данного гена у мягкой пшеницы являются функциональными и, в зависимости от структуры регуляторных районов, определяют различную чувствительность к яровизации (яровые и озимые формы) (Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). Классический генетический анализ выявил определенные комбинации доминантных и рецессивных гомеологов *VRN-1* у различных сортов яровой мягкой пшеницы, произрастающих в тех или иных климатических зонах (Pugsley, 1971; Stelmakh, 1993). Однако до сих пор неясны молекулярные механизмы регуляции данного гена, определяющие особенности взаимодействия гомеологов и их совместного влияния на фенотипический признак. Также остаются невыясненными пути и механизмы дивергенции гомеологов *VRN-1* на различных стадиях эволюции: от диплоидных предков до различных аллополиплоидных форм 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 для фундаментальных исследований. 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. Впервые показано, что эти изменения неслучайны и приводят к формированию той организации рДНК, 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, умеренно-копийные гены, кодирующие рРНК, тандемные повторы; 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.

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 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 молодежной научно-методической конференции "Проблемы молекулярной и клеточной биологии" (2007, Томск), Международной конференции "Хромосома 2009" (2009, Новосибирск), 19-м международном симпозиуме по картированию (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 пшеницы и геномика» (2011, Новосибирск), 2-й Международной конференции «Растение, генетика, геномика и биотехнология» (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 растений, геномика, биоинформатика и биотехнология» (2015, Новосибирск), 10-й Международной конференции по биоинформатике, регуляции генома и структурной биологии (BGRS) (2016, Новосибирск), Международном симпозиуме по системной биологии и биоинформатике (2016, Санкт-Петербург).

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 теме диссертации опубликовано 27 статей в ведущих 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,

заклучения, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Аллополиплоидизация- основной фактор эволюции высших растений

Полиплоидизация (кратное увеличение числа набора хромосом) является важнейшим фактором видообразования растений (Adams and Wendel, 2005). Полиплоидия широко распространена среди покрытосеменных растений и, в целом, можно выделить два типа полиплоидов: автополиплоиды и аллополиплоиды. Автополиплоиды образуются путем кратного умножения числа хромосомных наборов одного вида (Stebbins, 1971; Chen and Ni, 2006). Аллополиплоиды обычно происходят в результате гибридизации между двумя видами, что приводит к объединению различающихся хромосомных наборов этих видов в одном ядре. Объединение геномов различных видов может обеспечить не только сочетание их генетических особенностей, но и создает новые возможности для создания генетического разнообразия в результате межгеномного взаимодействия, что делает аллополиплоидию потенциальным источником новых видов (Soltis and Soltis, 1999; Otto and Whitton, 2000; Pires et al., 2004; Adams and Wendel, 2005).

Были описаны несколько механизмов формирования аллополиплоидов. Двуступенчатая модель предполагает формирование аллотетраплоида в результате межвидового скрещивания с последующим удвоением хромосом в соматических клетках гибрида (Рис. 1А). Одноступенчатый механизм предполагает образование аллополиплоида путем слияния нередуцированных мужских и женских гамет диплоидных видов. Последние формируются в результате нарушений мейоза на стадии первого деления (FDR: first division restitution) или второго деления (SDR: second division restitution) (Рис. 1Б) (Ramsey and Schemske, 1998). Прямая гибридизация между двумя автополиплоидными видами является частным случаем одноступенчатого механизма (Рис. 1В). Механизм триплоидного моста (triploid-bridge) включает стадию объединения нередуцированной и

редуцированной гамет от двух диплоидных видов и затем нередуцированные гаметы триплоида сливаются с редуцированными гаметами диплоида с образованием стабильного аллотетраплоида (Ramsey and Schemske, 1998; Yamauchi et al., 2004).

До 1970 года считалось, что полиплоиды образуются в основном путем соматического удвоения хромосом (зиготы или клетки меристемы). Начиная с 1975 года начали накапливаться работы, показавшие широкое распространение механизма нередуцированных гамет, как основного источника образования аллополиплоидных видов растений (Harlan and De Wet, 1975; Parrott and Smith, 1984; Lelley et al., 1987; Veronesi et al., 1988; Van Tuy et al., 1989; Jones, 1990; Ray and Tokach, 1992; Pringle and Murray, 1992).

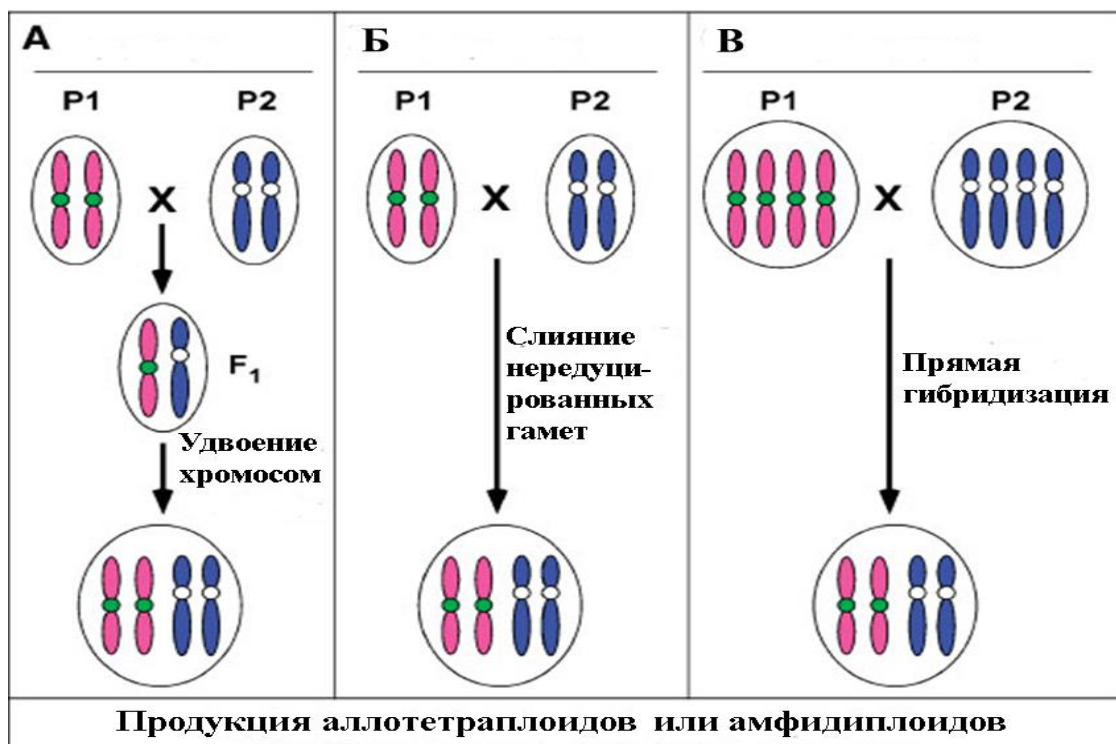


Рис.1 Модели формирования аллополиплоидов (Chen and Ni, 2006). **А-** амфидиплоид формируется в результате гибридизации между двумя диплоидными родительскими растениями, принадлежащими разным видам (P1 и P2) с последующим удвоением хромосом («двуступенчатая» модель); **Б-** слияние нередуцированных мужских и женских гамет приводит к образованию амфидиплоида («одноступенчатая модель»); **В-** амфидиплоид образуется путем прямой гибридизации между двумя растениями, принадлежащими разным автотетраплоидным видам («одноступенчатая модель»).

Образование естественных аллополиплоидов в природе могут существенно ограничивать экологические барьеры, гибридная несовместимость (пре- и постзиготические репродуктивные барьеры), а также низкие частоты образования нередуцированных гамет и хромосомного удвоения. Фертильность вновь-образованных аллополиплоидов зачастую понижена из-за мейотической нестабильности, возникающей в результате спаривания гомеологичных хромосом и рекомбинаций между ними. Тем не менее, аллополиплоидия весьма широко распространена среди растений и многократно происходила в истории многих видов (Soltis and Soltis, 1993). На основании анализа данных, полученных в результате секвенирования геномов было установлено, что многие виды, ранее считавшиеся диплоидными, на самом деле являются древними полиплоидами (палеополиплоидами) (Wolfe, 2001; Cui et al., 2006). Это может свидетельствовать о том, что растения в ходе эволюции выработали довольно эффективные способы преодоления вышеназванных барьеров. Сам факт широкого распространения аллополиплоидов в природе указывает на их селективное преимущество. В качестве основы для этого преимущества рассматриваются явления гетерозиса, дозового эффекта генов, увеличения генетического разнообразия и репродуктивные качества (Comai, 2005; Osborn et al., 2003). Гетерозис или «гибридная сила» заключается в повышении жизнестойкости и плодовитости гибридов, ускорении роста и увеличении их размера, по сравнению с родительскими видами. Эти свойства могут обеспечиваться за счет взаимного усиления эффектов различных аллелей в гетерозиготном состоянии (Chen, 2010; Nasrallah et al., 2000; Fujimoto et al., 2011). В частности, гибрид между *Arabidopsis arenosa* и *A. thaliana* проявляет гетерозисный фенотип в результате усиления регуляторных эффектов генов, контролирующих циркадный ритм (Ni et al., 2009). Влияние дозы генов на их экспрессию и фенотип также может служить причиной гетерозиса (Osborn et al., 2003; Guo et al., 1996). Увеличение количества генов создает потенциальную возможность

подавления вредоносных рецессивных аллелей доминантными (Comai, 2005). Помимо приобретения устойчивости к нуль-мутациям, предполагается, что дублицированные гены обеспечивают разнообразие паттернов экспрессии, что облегчает адаптивную эволюцию (Ha et al., 2009).

Другое преимущество аллополиплоидов заключается в их репродуктивной системе. Для большинства аллополиплоидов характерна самосовместимость, или способность к самоопылению (даже когда оба или один из родителей-перекрестноопыляемые), которая благоприятствует быстрому размножению (Comai, 2005; Okamoto et al., 2007). Хотя самосовместимость может приводить к инбредной депрессии путем накопления рецессивных аллелей, тем не менее аллополиплоиды более толерантны к нему, чем диплоидные виды, благодаря увеличению копий генов (Comai, 2005).

1.1.1. Распространенность полиплоидов среди покрытосеменных растений

На основании данных сравнительной геномики, дивергенции между предковыми формами голосеменных и покрытосеменных растений предшествовала дупликация геномов, имевшая место около 300 млн лет назад (Bowers et al., 2003; Paterson et al., 2004). В дальнейшем, эволюция покрытосеменных сопровождалась еще несколькими раундами дупликаций геномов, которые имели место около 70 млн лет назад (до отделения злаков от других однодольных) и около 20 млн лет назад (до появления независимых таксонов *Oryza*, *Sorghum* и *Hordeum*) (Paterson et al., 2004). За каждым раундом дупликации следовал продолжительный период структурно-функциональной диплоидизации генома, который сопровождался делецией многих дублицированных генов или их сайлесингом, активацией мобильных генетических элементов, появлением мутаций, а также реорганизацией хромосом (Levy and Feldman, 2002; Chen and Ni, 2006; Wang et al., 2005). Как следствие этих геномных изменений

происходила дивергенция на независимые филогенетические ветви (Wang et al., 2005).

Благодаря способности к скрещиванию разной степени дивергировавших групп покрытосеменных растений возникали гибридные комбинации, которые после очередной дупликации геномов могли стать родоначальниками новых видов. Полагают, что вследствие таких событий около 11 млн лет назад появилась кукуруза *Z. mays* ($2n=20$)- древний сегментный аллотетраплоид (Gaut and Doebley, 1997; Gaut, 2001). Доказательством этого служит, во первых, число хромосом,- в два раза превышающее число хромосом представителей трибы *Andropogoneae*, а во вторых, данные молекулярного анализа. Анализ нуклеотидных последовательностей дублированных генов выявил два набора, различающихся по времени дивергенции (~20 млн лет и 11 млн лет назад). Можно предположить, что часть хромосом подверглась рекомбинации после образования полиплоида 11 млн лет назад, тогда как другая часть не подвергалась рекомбинации и дублированные фрагменты этих хромосом имеют возраст общего предка около 20 млн лет.

Другой пример образования аллотетраплоидов- процесс видообразования у хлопчатника (*Gossypium*) (Adams et al., 2003). Существуют две крупные филогенетические группы диплоидных видов ($2n=26$): группа американских видов (D-геном) и виды Старого Света (A, G- геномы), которые отделились от общего предка примерно 7.5 млн лет назад. Около 1.5 млн лет назад с участием этих видов возник аллотетраплоид (AADD; $2n=52$), который стал родоначальником пяти новых видов, два из которых: *Gossypium hirsutum* и *G. barbadense* благодаря высоким качествам и большой массе волокна возделываются как ценные технические культуры, (Wendel and Cronn, 2003; Lee et al., 2007).

Рапс (*Brassica napus*) является аллотетраплоидом (AACC), A- и C-геномы которого соответствуют геномам *B. rapa* (китайская капуста или репа) и *B. oleracea* (капуста, брокколи) (Nagaharu, 1935). Оба диплоидных вида

культивируются, главным образом, как овощные культуры, тогда как рапс возделывается как масличная культура.

Рис, *Oryza sativa*, является важнейшей продовольственной культурой и наиболее охарактеризованным палеополиплоидом среди высших растений (Goff et al., 2002). Была исследована хромосомная локализация для более 2 000 дублированных генов риса. Анализ хромосомных карт риса показал, что, в основном, дублированные сегменты хромосом имеют относительно небольшой размер, что предполагает большое количество транслокаций, имевших место после дубликации генома. На основании времени дивергенции дублированных генов, которое оценивалось по уровню аминокислотных замен в соответствующих белковых продуктах, было установлено предполагаемое время полиплоидизации- 40-50 млн лет назад (Goff et al., 2002).

Формирование многих полиплоидных таксонов у покрытосеменных растений происходило многократно, о чем свидетельствует наличие полиплоидных рядов и у однодольных и у двудольных (Stebbins, 1971; Grant, 1981). Так, появление аллогексаплоидной мягкой пшеницы *T. aestivum* (BBAADD; $2n=42$) обусловлено двумя независимыми, сравнительно недавними событиями межвидовой гибридизации (Dubcovsky and Dvorak., 2007; Matsuoka, 2011). Первое событие- формирование аллотетраплоидной пшеницы (BBAА; $2n=28$) в результате скрещивания предковых диплоидных видов *T. urartu* (AA; $2n=14$) и *Ae. speltoides* (BB; $2n=14$) произошло 0.5-3 млн лет назад. Второе событие- появление гексаплоидной пшеницы путем скрещивания аллотетраплоида *T. dicoccum* (BBAА; $2n=28$) и *Ae. tauschii* (DD; $2n=14$) произошло примерно 7-9 тыс лет назад (Рис. 2). Следует отметить, что как аллотетраплоидная твердая пшеница, так и аллогексаплоидная мягкая пшеница относятся к наиболее распространенным культурным растениям: первая используется для производства кондитерских и макаронных изделий, тогда как вторая является основной хлебопекарной культурой.

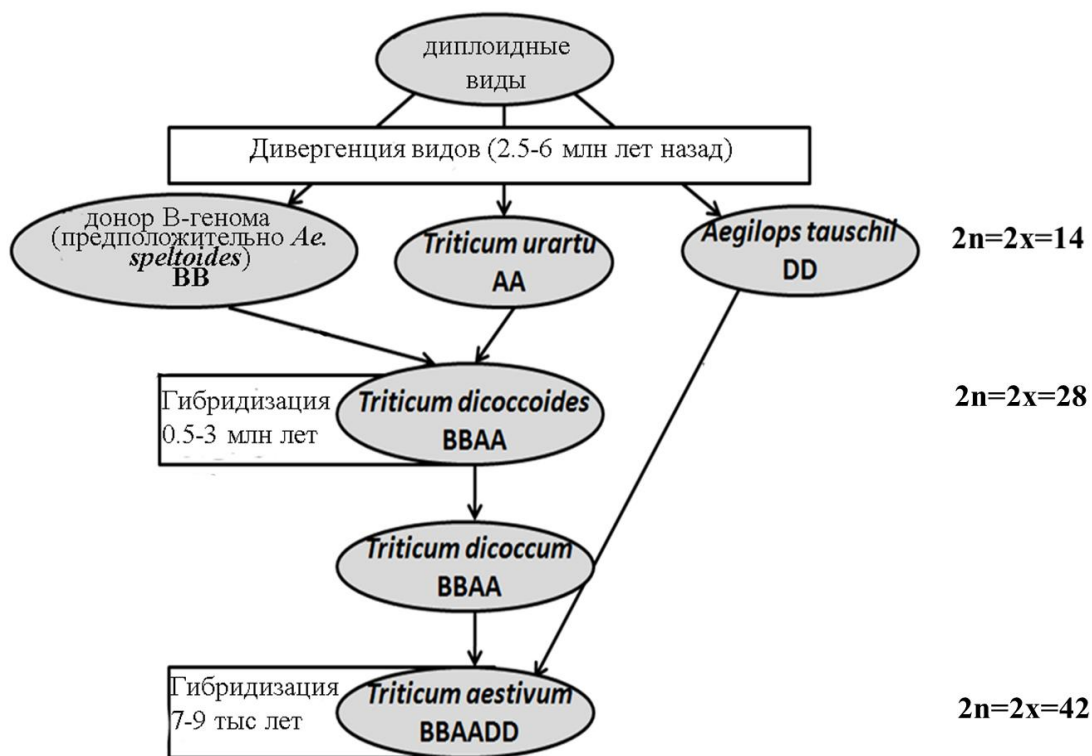


Рис.2 Происхождение аллогексаплоидной пшеницы *T.aestivum* L. (BBAADD; $2n=42$). Оценка времени дивергенции диплоидных видов и событий полиплоидизации основывается на измерении скорости эволюции ряда генов (Blake et al., 1999; Huang et al., 2002; Dvorak et al., 2006).

Таким образом, аллополиплоидия способствовала распространению большинства хозяйственно-ценных культурных растений, благодаря формированию ряда ценных агротехнических свойств, высокой продуктивности и более широкому адаптивному потенциалу по сравнению с диплоидными видами. Хорошо известна способность полиплоидов растений адаптироваться к экстремальным условиям. Например, частота полиплоидных видов варьирует от 37% в регионе Средиземноморья до 85.9% в Гренландии, а высокогорная флора примерно на 80-85% представлена полиплоидами, в то время как у подножия гор полиплоидных видов не более 40-45% (Grant, 1981). В целом, среди покрытосеменных растений, по разным оценкам, насчитывают от 30 до 80% полиплоидных видов (Soltis et al., 2003).

1.1.2. Репродуктивные барьеры в ходе формирования аллополиплоидов

Существует множество репродуктивных барьеров для естественного формирования аллополиплоидов на пре- и постзиготической стадиях (Rieseberg and Blackman, 2010). К презиготическим относятся географические барьеры, изоляция опылителей (структура и цвет цветка, как факторы привлечения) и время цветения (Rieseberg and Blackman, 2010; Mayfield et al., 2011). Замедление прорастания пыльцевой трубки, остановка роста пыльцевой трубки в яйцеклетке и односторонняя несовместимость при скрещивании (ассиметрическое отторжение пыльцы) составляют презиготические барьеры после стадии опыления. После прохождения стадии прорастания пыльцевой трубки и оплодотворения, начинают действовать постзиготические барьеры, такие как нежизнеспособность гибрида (Rieseberg and Blackman, 2010). Недостаточное или избыточное развитие эндосперма, служащего источником питания для развивающегося зародыша, является постзиготическим барьером, зависящим от направления скрещивания (Johnston and Hanneman, 1982; Kihoshita, 2007). Общая особенность аберрантного развития эндосперма, наблюдаемого при межвидовых скрещиваниях и скрещиваниях растений различной ploidy, заключается в преждевременной или отсроченной стадии деления на клетки-целлюляризации (cellularization) в ходе раннего эмбриогенеза. Недавние исследования показали, что важное значение при этом имеет геномный импринтинг, или процесс контроля экспрессии генов в зависимости от того, от какого родителя они наследуются (Kohler et al., 2010). Другой постзиготический барьер связан с гибридной стерильностью, описанной в генетической модели несовместимости Добжанского-Мюллера (Rieseberg and Blackman, 2010). Иногда межвидовые гибриды проявляют мужскую стерильность, даже если они успешно прошли стадию полиплоидизации. Один из наиболее распространенных типов мужской стерильности обусловлен несовместимостью между ядерным геномом и наследуемым по материнской линии митохондриальным геномом, а именно:

цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) (Hanson and Bentolila, 2004). Межвидовые и межродовые скрещивания могут приводить к ЦМС в результате изменения характера воздействия ядерного генома на экспрессию митохондриальных генов (Leino et al., 2005). К репродуктивным барьерам относится также пониженная фертильность гибридов, связанная с цитогенетической нестабильностью хромосом в ходе мейоза. Далее, на примере *Ph1* локуса мягкой пшеницы будет рассмотрен генетический механизм преодоления этого барьера.

1.1.2.1. Геномный импринтинг

В целом, материнские и отцовские аллели различных генов экспрессируются одинаково у диплоидов, однако, некоторые гены проявляют неэквивалентный характер экспрессии, в зависимости от того, от какого родителя унаследован тот или иной аллель. Данное явление получило название геномного импринтинга (ГИ) (Reik and Walter, 2001). ГИ наблюдается как у млекопитающих, так и у цветковых растений и регулируется с помощью эпигенетических изменений (метилование ДНК или модификации гистонов в составе хроматина). Гены, участвующие в геномном импринтинге были детально изучены у модельного растительного объекта, *Arabidopsis thaliana* (Kohler et al., 2012). В эндосперме экспрессируются только материнские аллели генов *Mea* (*Medea*) и *FIS2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2*), тогда как отцовские аллели подвергаются супрессии (сайлесингу). С другой стороны, *PHE1* (*PHERES 1*) ген экспрессируется только в отцовском геноме. Импринтинг этих генов регулируется с помощью эпигенетического механизма, включающего метилирование ДНК и модификации гистоновых белков (Kohler et al., 2012). Были идентифицированы гены, кодирующие компоненты Polycomb комплекса белков, который осуществляет процесс метилирования гистонов. Матерински- экспрессируемые аллели *MEA* и *FIS2*, а также аллель *PHE1*, экспрессируемый с отцовской стороны, регулируют развитие эндосперма в

противоположных направлениях. Эта антагонистическая регуляция может объяснить наблюдаемые фенотипы межвидовых гибридов и согласуется с гипотезой родительского конфликта (Haig and Westoby, 1991). Было установлено, что *Meg1* (*Maternally expressed gene 1*) кукурузы необходим для развития клеток эндосперма, обеспечивающих транспорт питательных веществ между семенем и материнской тканью (проводящих клеток) (Costa et al., 2006). Избыточная экспрессия данного гена приводит к несбалансированному развитию эндосперма (Рис. 3). Этот ген также играет важную роль в регуляции скорости поглощения питательных компонентов и депонировании сахарозы (Costa et al. 2012). Эти данные являются первым доказательством функциональной роли генов ГИ в обеспечении сбалансированного питания тканей зародыша.

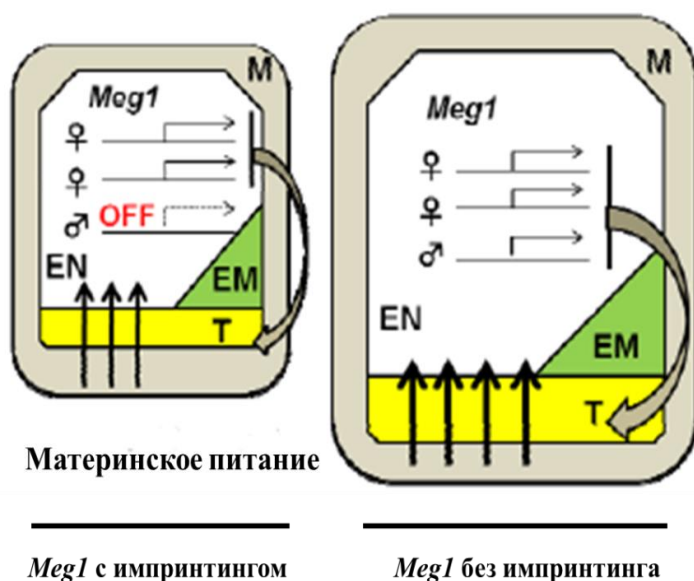


Рис.3 Импринтинг *Meg1* гена кукурузы и его роль в материнском питании и развитии зародыша. *Meg1* импринтинг через процесс дифференцировки проводящих тканей влияет на распределение питательных веществ (показано стрелками) и размер семени. EM- зародыш; EN- эндосперм; Т и М- проводящая и материнская ткани (Costa et al., 2006).

Ряд исследований показали роль ГИ в создании репродуктивного барьера. Гибридный эндосперм у гибрида *A. thaliana* (♀) x *A. arenosa* (♂) проявляет усиленный рост, который приводит к аномалиям развития зародыша (Josefsson et al., 2006). В гибридном эндосперме выявлена двуаллельная экспрессия *MEA* и *PHE1*, что свидетельствует о нарушении импринтинга этих генов. Нарушение импринтинга *PHE1* может вызывать продолжительную и стабильную экспрессию *AGL62* (*AGAMOUS-LIKE 62*),

который ингибирует целлюляризацию (Kang et al., 2008). Измененная экспрессия *OsMADS87*, гомолога *PHE1* наблюдалась в эндосперме гибрида между культурным и диким видами риса (Ishikawa et al., 2011). Эти данные указывают на то, что межвидовые различия в эпигенетическом статусе *PHE1* могут вызывать нарушение регуляции ГИ у гибрида и служить в качестве репродуктивного барьера для межвидовой гибридизации и аллополиплоидизации.

1.1.2.2. Цитоплазматическая мужская стерильность

Межвидовые гибриды иногда проявляют мужскую стерильность, которая известна под термином гибридная стерильность. Чаще всего мужская стерильность вызывается несовместимостью между митохондриальным и ядерным геномами. Наблюдается большое разнообразие ЦМС фенотипов от различных аномалий в структуре цветка до нарушений созревания пыльцы. ЦМС является матерински наследуемым фенотипом и находится под контролем митохондриального генома.

Митохондрии растительной клетки имеют свои отличительные особенности, по сравнению с митохондриями животных: крупный размер генома (200-2400 тпн, в зависимости от вида) и сложную структуру из-за большого количества крупных повторяющихся последовательностей (Kubo and Newton, 2008). Эти повторы могут индуцировать рекомбинации и создавать химерные открытые рамки считывания (ОРС) (Hanson and Ventolila, 2004). Экспрессия некоторых новых ОРС связана с ЦМС. Путем сравнения экспрессии генов в нормальных растениях и в растениях с ЦМС были установлены ЦМС-связанные гены у многих видов (Schnable and Wise, 1998). Эти гены часто имеют химерную структуру и содержат транс-мембранные домены. Экспрессия генов ЦМС может супрессироваться особым ядерным фактором, который транспортируется в митохондрии и приводит к восстановлению фертильности. Ген, кодирующий этот фактор был назван восстановителем фертильности, *Rf* (*Restorer of fertility*). Только

генотипы, имеющие мутантные митохондрии и являющиеся рецессивными гомозиготами по *Rf*-генам, являются стерильными, все остальные генотипы являются фертильными.

Rf- гены делятся на два типа: PPR (pentatricopeptide)- тип и non-PPR- тип. Первый тип представлен РНК-связывающими белками, которые участвуют в посттранскрипционных процессах (РНК-коррекция, РНК-сплайсинг, расщепление РНК и трансляция) в органеллах (Schmitz-Linneweber and Small, 2008). *Rf*- гены у *Petunia hybrida* (*Rf-PPR592*), *Raphanus sativus* (*Rfo/Rfk*), *Oryza sativa* L. (*Rf1a* и *Rf1b*), а также *Sorghum bicolor* (*Rf1*) кодируют PPR-белки (Bentolila et al., 2002; Brown et al., 2003; Kazama and Toriyama, 2003; Klein et al., 2005; Wang et al., 2006). Экспрессия этого типа белков, как было показано, приводит к уменьшению уровня продуктов ЦМС-связанных генов в митохондриях (Kazama et al., 2008). Это предполагает прямое действие PPR-белков на указанные гены, приводящее к устранению причины ЦМС в митохондриях. Второй тип *Rf*- генов включает *Rf2a* кукурузы (*Zea mays*), кодирующий альдегиддегидрогеназу, и *Rf2/ Rf17* гены риса (*O.sativa*) (Fujii and Toriyama, 2009; Itabashi et al., 2011). Последние кодируют глицин-обогащенный белок (*Rf2*) и белок, содержащий АСРС-подобный (acyl-carrier protein synthesis-like) домен, соответственно. Экспрессия *Rf2a* у кукурузы не приводит к уменьшению накопления продукта ЦМС-связанного гена URF13, однако, ген *Rf2a* необходим для нормального развития пыльцы (Liu et al., 2001). Присутствие *Rf17* у риса также не влияет на уровень транскриптов ЦМС-гена *CW-orf307* (Fujii et al., 2010). Экспрессия *Rf17* зависит от митохондриального гаплотипа (Fujii and Toriyama, 2009), что указывает на то, что сигналы от митохондрий к ядру (ретроградные сигналы) контролируют экспрессию этого гена.

Предполагалось, что ЦМС вызывается недостаточной продукцией АТФ для развития пыльцы, благодаря токсическому эффекту ЦМС-связанных генов в митохондриях (Allen et al., 2007; Meyer et al., 2009). Наряду с этим была выдвинута гипотеза о том, что ретроградные сигналы из митохондрий

определяют: приведет ли накопление продуктов ЦМС-связанных генов к мужской стерильности (Fujii and Toriyama, 2009). Продукты ЦМС-связанных генов аккумулируются в митохондриях растений с ЦМС, что нарушает нормальное состояние митохондрий и запускает поток сигналов в ядро (Рис. 4а). Эти сигналы приводят к дисбалансу экспрессии ядерных генов, контролирующих развитие пыльцы, а, следовательно, - к мужской стерильности. При наличии в ядерном геноме PPR- типа *Rf* гена, соответствующий продукт поступает в митохондрии и супрессирует экспрессию (и/или накопление) продукта ЦМС-гена (Рис. 4б). В результате митохондрия прекращает или снижает ретроградные сигналы, так что экспрессия ядерных генов развития пыльцы возвращается к норме, характерной для фертильных растений без ЦМС. В случае non-PPR- типа *Rf* накопление продукта ЦМС- гена не прекращается. В этом случае продукт *Rf* может улучшать метаболическое состояние митохондрий, что, также как в первом случае, приводит к снижению ретроградных сигналов и восстановлению фертильности (Рис 4в). Молекулярные основы ретроградных сигналов из митохондрий еще предстоит выяснить, что позволит найти способы для преодоления несовместимости ядерного и митохондриального геномов.

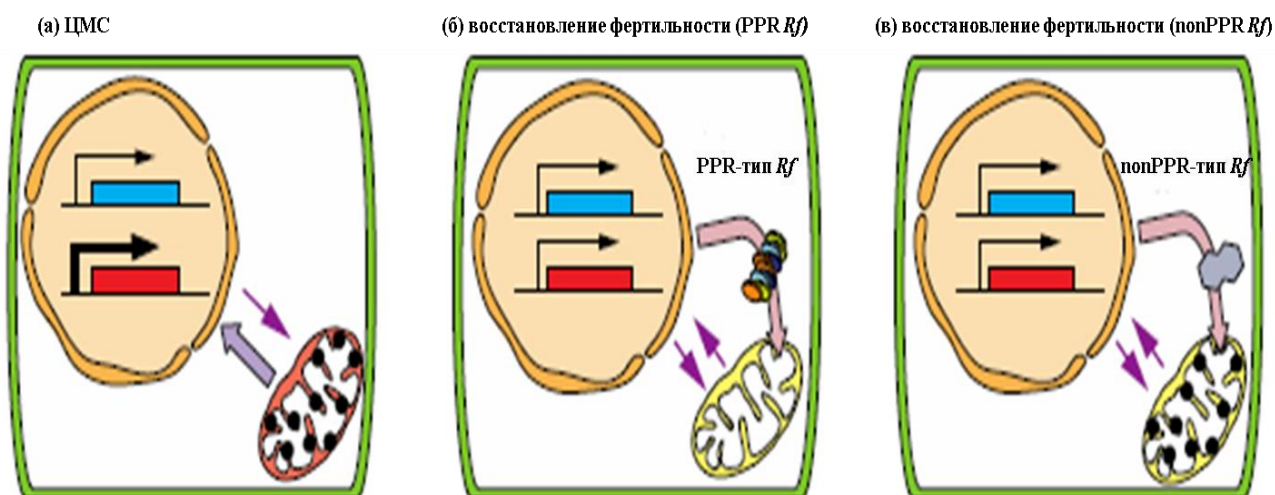


Рис.4 Гипотетическая схема ретроградных сигналов из митохондрий, обуславливающих ЦМС и восстановление фертильности (Fujii and Toriyama, 2009).

1.1.2.3. Роль *Ph1* локуса в обеспечении фертильности аллополиплоидов пшеницы

Точность механизма, обеспечивающего правильное (спаривание только гомологичных хромосом родительских субгеномов) поведение хромосом в ходе мейоза имеет главное значение для поддержания фертильности аллополиплоидных растений. У пшеницы данный механизм контролируется локусом *Ph1*, расположенным в хромосоме 5В (Griffiths et al., 2006). Этот локус содержит комплекс из 7 генов, кодирующих белки, сходные с циклин-зависимыми киназами (Cdk; Cyclin dependent kinase) (Griffiths et al., 2006; Al-Kaff et al., 2008). Гомеологичные районы на хромосомах 5А и 5D содержат пять и два *Cdk*-подобных гена, соответственно. Из указанных 14 генов, по крайней мере, одна копия (5В2, 5А3 и 5D2) в каждом геноме имеет полную ОРС. Однако, есть основания полагать, что копия 5В2 является дефектной (Al-Kaff et al., 2008). Сравнительный структурный анализ показал, что *Ph1* (*Cdk*-подобные) гены имеют гомологию с геном *Cdk2* млекопитающих, который контролирует структуру хроматина и тем самым регулирует процессы репликации ДНК, синапсиса и рекомбинации хромосом (Yousafzai et al., 2010). *Cdk2* белок как у млекопитающих, так и у пшеницы, фосфорилирует гистон H1, в специфических позициях аминокислот (Greer et al., 2012). Предполагается, что у растений с *Ph1*(+) фенотипом (спаривание только гомологов) гены в составе *Ph1* локуса кодируют дефектные *Cdk*-белки, имеющие пониженную активность, что приводит к снижению фосфорилирования гистона H1. Последнее обуславливает задержку деконденсированного состояния хромосом и предотвращение их синапсиса на стадии пахитены (Рис. 5). В случае *Ph1*(-) фенотипа гомеологичные хромосомы конденсируются быстрее, что приводит к их синапсису и рекомбинации.

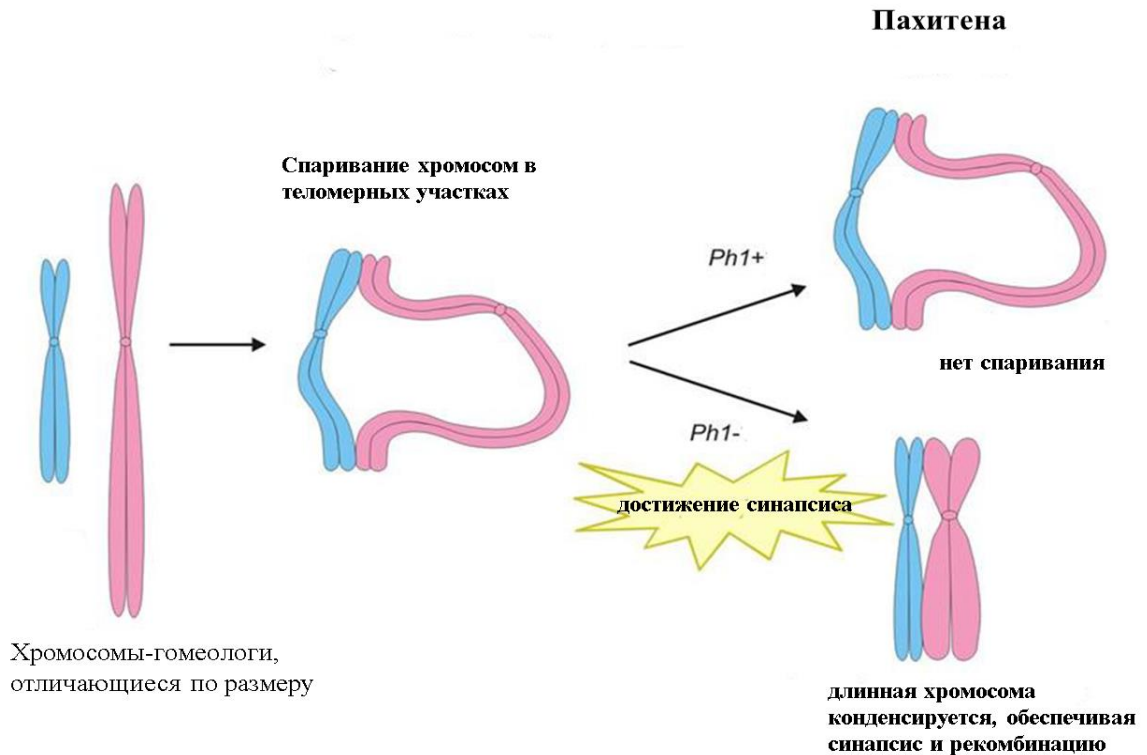


Рис. 5 Модель влияния *Ph1* локуса на синапсис гомеологичных хромосом и рекомбинацию (адаптировано из http://www.jic.ac.uk/staff/graham-moore/wheat_meiosis.htm)

1.1.3. Самосовместимость как механизм воспроизводства аллополиплоидов на ранних стадиях

Перекрестное скрещивание, обусловленное самонесовместимостью, играет важное значение в предотвращении инбридинга, поэтому этот механизм имеет преимущество для эволюционного развития растения в долговременном масштабе. Когда же существует ограничение в скрещивании, противоположный механизм (самосовместимость) получает эволюционное преимущество (Comai, 2005; Goldberg et al., 2010). Аллополиплоиды в основной массе являются самосовместимыми, в отличие от их родительских линий (Kimura et al., 2002; Okamoto et al., 2007). Естественное появление аллополиплоидов - довольно редкое явление и приобретение самосовместимости может давать существенное преимущество для их выживания до момента становления популяции нового

полиплоидного вида (Goldberg et al., 2010). Более того, поскольку аллополиплоиды содержат два и более различных геномов (гетерозиготность), риск инбредной депрессии у них меньше, чем у диплоидных растений, что уменьшает давление отбора на поддержание перекрестного скрещивания (Comai, 2005). Таким образом, самосовместимость может поддерживаться в течении длительного времени эволюции аллополиплоидов.

Самонесовместимость является механизмом для предотвращения самооплодотворения у многих растительных видов. Этот механизм у видов Brassicaceae контролируется моногенно, мультиаллельным локусом *S*, который определяет несовместимость пыльцы и клеток рыльца внутри одного растения. Существует два основных типа самонесовместимости: гаметофитная и спорофитная. В первом случае, *S*-фенотип пыльцы определяется ее собственным гаплоидным геномом, тогда как при спорофитной *S*-фенотип определяется родительским диплоидным геномом (Такаяма and Isogai, 2005).

Виды Brassicaceae имеют спорофитную самонесовместимость, в основе которой лежит специфическое взаимодействие между детерминантом рыльца, *SRK* (*S* рецептор киназы) и детерминантом пыльцы, *SP11* (цистеин-богатый белок 11/*S* локуса). Указанные продукты прикрепляются друг к другу, что запускает процесс ингибирования прорастания пыльцевой трубки (Такаяма and Isogai, 2005; Fujimoto and Nishio, 2007). Гены *SRK* и *SP11* не разделяются рекомбинационно и передаются потомству сцепленно (*S*-гаплотип). Существуют два *S*-гаплотипа: класс I; доминантный, класс II; рецессивный. В пыльце *S*-гетерозиготных растений (класс I/ класс II) транскрипция *SP11* класса II подавляется (Fujimoto and Nishio, 2007), что связано с ткане-специфичным *de novo* ДНК метилированием промоторных районов данного гена (Shiba et al., 2006). Было показано, что малая РНК *Smi* (*SP11 methylation inducer*), гомологичная промоторному району аллеля *SP11* класса II транскрибируется внутри соответствующего локуса класса I

(Tarutani et al., 2010). *Smi* РНК направляет процесс метилирования ДНК промоторного района *SP11* класса II, что приводит к подавлению экспрессии этого гена в пыльце S-гетерозиготных растений.

Окамото и соавторы (Okamoto et al., 2007) предположили, что описанные выше взаимоотношения S-гаплотипов важны для объяснения самосовместимости *B. napus*. Этот вид является аллотетраплоидом (АС-геном) и имеет два S-гаплотипа: класса I от А генома и класса II от С-генома. Первый гаплотип содержит мутации в составе *SP11* или *SRK*, которые блокируют функционирование данных генов. Анализ комплементации подтвердил, что нуль-мутация *SP11* класса I обуславливает самосовместимость *B. napus* (Tochigi et al., 2011). В синтетических межвидовых гибридах между *B. rapa* (S-гомозиготный по классу I) и *B. oleracea* (S-гомозиготный по классу II), экспрессия *SP11* класса II супрессируется, что указывает на доминирование противоположного S-гаплотипа (Kimura et al., 2002). Предполагается, что вновь синтезированный аллотетраплоид становится самосовместимым в тот момент, когда ген *SP11* класса I теряет свою функцию в результате мутации, поскольку экспрессия *SP11* класса II остается супрессированной независимо от экспрессии гомеологичного гена (Рис. 6) (Okamoto et al., 2007; Fujimoto et al., 2006). Этот механизм кажется более предпочтительным, т.к. весьма маловероятно возникновение мутаций в обоих гомеологичных S-генах за короткий промежуток времени. Таким образом, мутации в одном доминантном S-гаплотипе достаточно для потери самонесовместимости и эта особенность данной генетической системы могла быть использована для формирования самосовместимых аллополиплоидов в ходе эволюции.

В добавление к описанным выше мутациям, предполагается вклад эпигенетических изменений в формирование самосовместимости у аллополиплоидов (Nasrallah et al., 2007). Это было показано на модели синтетического межвидового гибрида, полученного при скрещивании между самоопыляемым видом *A. thaliana* (♀) и перекрестноопыляемым *A. lyrata* (♂) (Nasrallah, 2000; Fujimoto et al., 2011). В рыльцах гибрида и его

потомков экспрессия *SRK* гена (см. выше) *A. lyrata* была пониженной из-за aberrantного процессинга транскриптов этого гена (Nasrallah et al., 2007). В пыльце гибрида наблюдалась супрессия *SP11* гена. Указанные изменения паттернов экспрессии S-генов коррелировали с признаком самосовместимости, что указывает на возможность эпигенетических изменений в контроле данного признака у межвидовых гибридов (Nasrallah et al., 2007).

(а) Мутация в мужском родителе

(б) Мутация в женском родителе

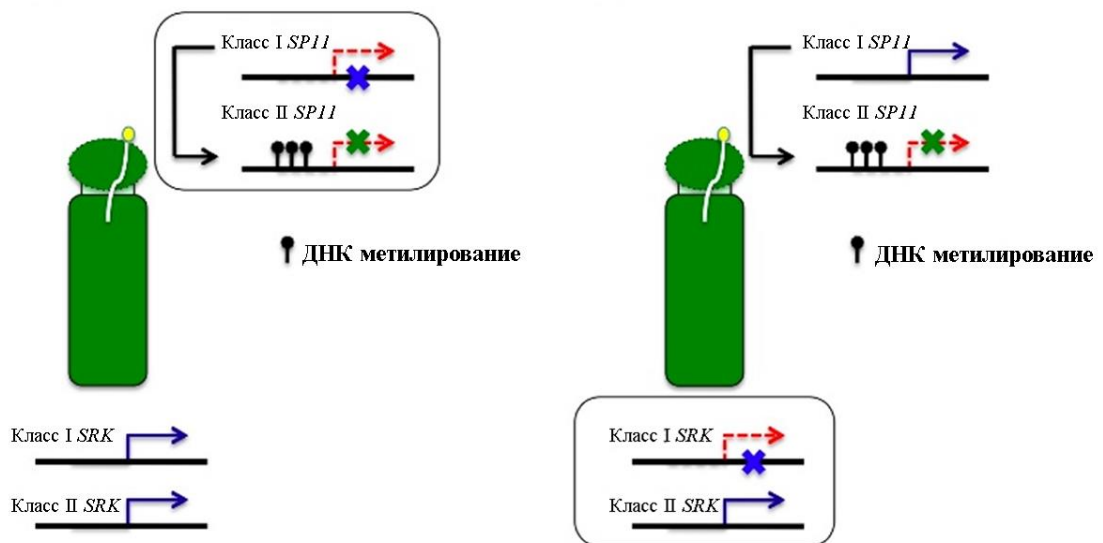


Рис 6. Два типа мутаций, вызывающих самосовместимость у рапса *B. napus* (Okamoto et al., 2007). (а) *SP11* класса I теряет свою функцию в результате мутации (синий крест), тогда как экспрессия *SP11* класса II супрессируется доминированием первого гена в пыльце (зеленый крест). (б) *SRK* класса I теряет свою функцию в результате мутации (синий крест) и *SP11* класса II находится в супрессированном состоянии (зеленый крест).

1.1.4. Искусственно-синтезированные аллополиплоиды

Искусственно синтезированные, или синтетические аллополиплоиды представляют уникальный материал для изучения самых ранних этапов формирования аллополиплоидов, поскольку можно провести их сравнение с родительскими диплоидными видами. В последнее время были разработаны эффективные способы получения синтетических аллополиплоидов (Рис. 7). На первом этапе необходимо преодолеть барьер геномной несовместимости,

особенно, в случае отдаленных видов. Для этого проводят тестирование различных комбинаций генотипов в межвидовых селекционных программах (Mejia-Jimenez et al., 1994). Используется ли генотип в качестве мужского или женского родителя имеет большое значение, поскольку зачастую наблюдается односторонняя несовместимость, особенно в скрещиваниях между самонесовместимым и самосовместимым видами (Murfett et al., 1996). Факторы внешней среды (температура) также могут влиять на скрещиваемость (Franken et al., 1988). Были разработаны различные подходы для преодоления презиготических барьеров, включая технику направленного опыления (Asano and Myodo, 1977) и обработку яйцеклетки регуляторами роста в момент опыления (Emsweller and Stuart, 1948).

После оплодотворения возникает проблема поддержания развивающегося зародыша, которая решается с использованием методик культуры ткани *in vitro*, особенно в случаях когда постзиготический барьер вызван недостаточным формированием эндосперма (см. главу 1.1.2.1.). Были разработаны многочисленные методики культивирования зародышей *in vitro* для различных объектов (Raghavan and Srivastava, 1982; Williams et al., 1987; Chen et al., 1986).

Гибриды, получаемые от скрещивания отдаленных видов зачастую стерильны и не могут быть использованы в селекционных программах. Восстановление гибридной фертильности может быть достигнуто зиготическим или соматическим удваиванием хромосом или путем образования нередуцированных гамет (Bretagnolle and Thompson, 1995; Lim et al., 2000; Nimura et al., 2006). Обработка колхицином, нарушающим формирование веретена деления, является эффективным способом соматической (митотической) полиплоидизации. Данное вещество или его производные используются для обработки различных соматических тканей и органов, таких как цветочные почки, проростки, апикальная меристема, пазухи листьев и тд (Jensen, 1974).

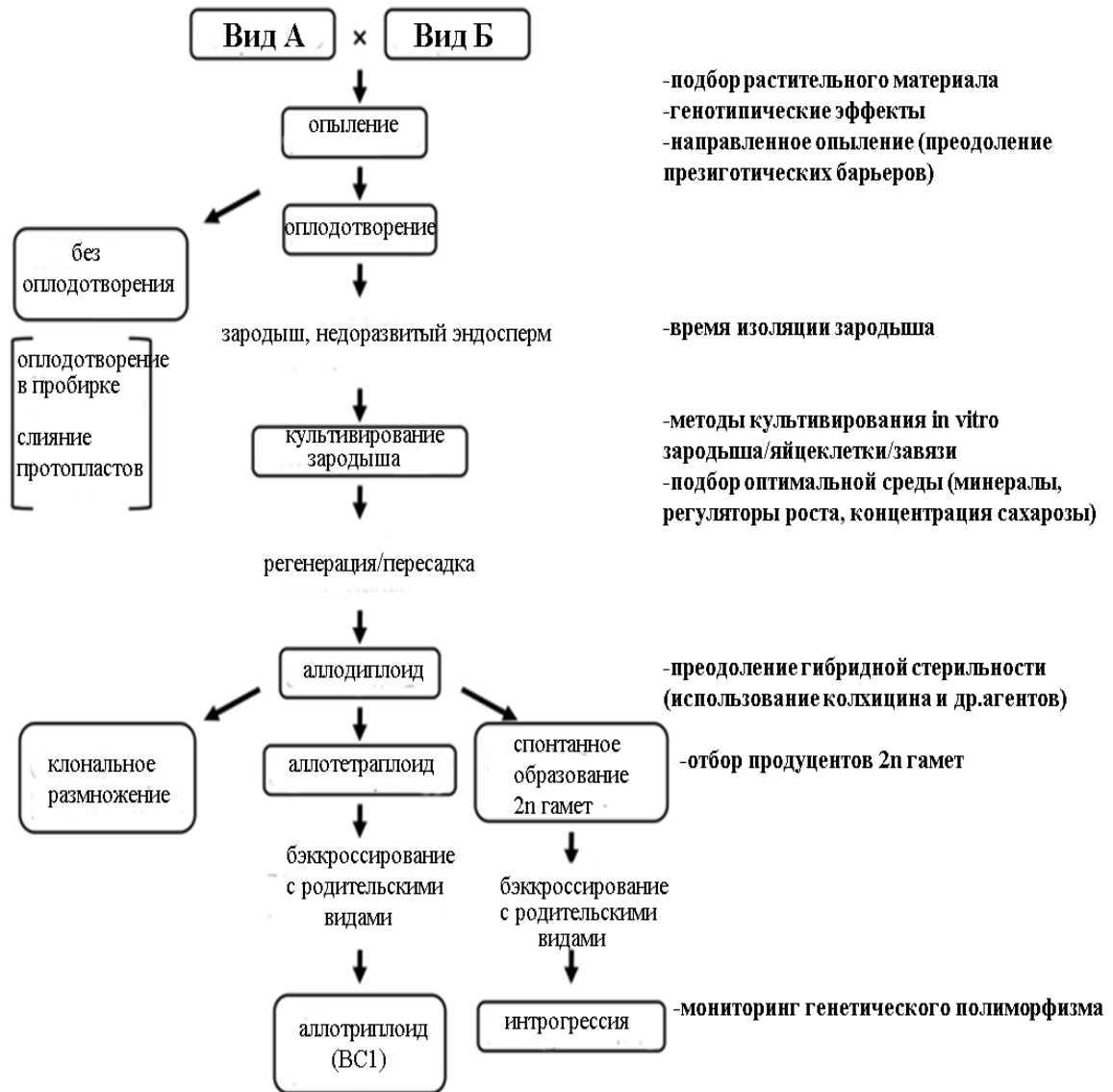


Рис. 7 Процедуры получения синтетических аллополиплоидов (Osabe et al., 2012).

Соматическое удваивание хромосом диплоидного межвидового гибрида дает начало аллотетраплоиду, или амфидиплоиду, содержащему два диплоидных субгенома различных видов. У такого амфидиплоида гомологичные хромосомы каждого субгенома конъюгируют, что обеспечивает нормальное протекание мейоза и продукцию фертильных гамет (Lim et al., 2000; Nimura et al., 2006). В то же время преимущественное спаривание гомологичных хромосом приводит к фиксированной гетерозиготности из-за блокирования мейотической рекомбинации между

субгеномами (Bretagnolle and Thompson, 1995; Ramanna and Jacobsen, 2003). Спонтанное формирование нередуцированных гамет в результате aberrантного мейоза (половая полиплоидизация) происходит в диплоидных видах, также как аллодиплоидных (Bretagnolle and Thompson, 1995; Barba-Gonzales et al., 2008). Половая полиплоидизация сопровождается спариванием и рекомбинацией гомеологичных хромосом в ходе мейоза у аллодиплоидов. Поэтому, в отличие от соматически полученных аллотетраплоидов, фертильная пыльца, возникшая в результате половой полиплоидизации передает потомству большое генетическое разнообразие, которое имеет значение для интрогрессивной селекции путем бэккроссирования с диплоидными родительскими видами (Ramanna and Jacobsen, 2003; Barba-Gonzales et al., 2008; Khan et al., 2009).

1.2. Структурно-функциональная организация генома высших растений

Геном эукариот, состоящий из молекул ДНК и связанных с ними белков, организован в виде дискретных хромосом. Каждая нереплицированная хромосома и метафазная хроматида содержит линейную и непрерывную молекулу ДНК, которая находится в деконденсированном состоянии внутри интерфазного ядра, а в ходе метафазы мейоза конденсируется в митотическую хромосому. Хромосомная организация определяет фундаментальные генетические процессы: регуляцию экспрессии генов, клеточное деление, репликацию и рекомбинацию (Spector, 2003). В пространственно-динамическом аспекте «хромосомную организацию» можно представить как процессы объединения, разъединения и реорганизации хромосом в ядре на разных стадиях функционирования организма, процессы необходимые для правильной реализации и передачи следующим поколениям наследственной информации (Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011). Многие особенности организации генома и хромосом являются общими для всех организмов, однако, есть некоторые элементы, которые отличаются между растениями и животными. Отличительная

особенность высших (покрытосеменных) растений - широкое распространение полиплоидии, либо в форме умножения хромосомного набора одного вида, либо в форме объединения геномов разных видов. Данное явление не является характерным для голосеменных растений, большинства позвоночных и насекомых. В этой связи было выдвинуто предположение, что большую роль в отделении и эволюции ветви покрытосеменных растений играли гены, обеспечивающие регулярный мейоз, а именно строгое бивалентное спаривание гомологичных, а не гомеологичных хромосом (Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011).

1.2.1. Молекулярная организация генома высших растений

ДНК ядерного генома растений содержит уникальные или низкокопийные кодирующие последовательности ДНК, непосредственно связанные с ними регуляторные элементы, а также различные классы повторяющейся ДНК, представленные умеренно- и высокоповторяющимися последовательностями (Heslop-Harrison and Schmidt, 1998). Умеренноповторяющиеся последовательности могут иметь кодирующую функцию, как, например, гены рибосомальной РНК (рРНК). Высокоповторяющиеся, как правило, не несут функцию кодирования белков, необходимых для функционирования и воспроизводства организма. Однако, они могут кодировать белки, важные для их пролиферации или поддержания числа копий в геноме (МЭ).

Повторяющиеся последовательности ДНК являются основным компонентом генома растений. По разным данным, у злаков к ним может относиться до 90-95% ядерной ДНК (Flavell et al., 1974; Li et al., 2004; Paux et al., 2006). Повторяющиеся последовательности представляют собой высокогетерогенную группу, представленную тысячами или даже десятками тысяч семейств, отличающихся по длине мотива, уровню копийности и организации в геноме (Flavell, 1986; Kubis et al., 1998; Heslop-Harrison, 2000). Секвенирование геномов модельных видов - риса и арабидопсиса (The

Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Initiative, 2000; Sequencing Project International Rice, 2005), а также детальные исследования других важных сельскохозяйственных культур, включая пшеницу и ее сородичей, ячмень, сахарную свеклу и другие виды, показали, что наиболее обширным классом повторяющихся последовательностей растений являются LTR-ретротранспозоны, составляющие свыше 50% размера их геномов (Bennetzen, 2000b; Li et al., 2004; Sharma and Raina, 2005; Paux et al., 2006). От 5 до 11% ДНК пшеницы представлено транспозонами, а на долю остальных классов повторяющихся последовательностей приходится порядка 30% ядерной ДНК.

Причины поддержания столь значительного количества повторяющихся последовательностей, а также высокого разнообразия их состава до конца не изучены. Предполагают, что они играют важную роль в стабилизации и поддержании структуры хромосом, участвуют в «узнавании» и правильном расхождении хромосом во время митоза и мейоза (Vershinin et al., 1995; Kubis et al., 1998). Локусы некоторых семейств сателлитных ДНК выступают как точки рекомбинации хромосом в мейозе (Linares et al., 1998; Vershinin et al., 1995). Теломер-ассоциированные повторы выполняют функцию защиты теломер и участвуют в регуляции генов, локализованных в субтеломерных районах (Sykova et al., 2003). Показано, что видообразование у растений часто связано с быстрыми изменениями фракции повторяющихся последовательностей ДНК (Flavell et al., 1979; Cuadrado and Jouve, 2002; Dvorak, 1998).

1.2.1.1. Размер ядерного генома у высших растений

Размер ядерного генома у высших (покрытосеменных) растений чрезвычайно изменчив, хотя для каждого вида он обычно имеет относительно постоянное значение (Swift, 1950). Размер генома, измеряемый в количестве ДНК (в парах нуклеотидов, пн) на гаплоидный геном (1С), варьирует от 63 Мпн у плотоядного растения *Genlisea aurea* ($2n=52$) до

149 000 Мпн у вида лилий *Paris japonica* ($2n=40$), т.е. различия могут достигать 2 300 раз (Bennett and Leitch, 2011). К растениям с маленьким геномом (< 200 Мпн) относятся одно семейство однодольных и 13 семейств двудольных. Растения с огромным геномом ($>15\ 000$ Мпн) часто встречаются среди однодольных, особенно относящихся к порядку Liliales, тогда как только девять семейств двудольных имеют виды с таким геномом (Bennett and Leitch, 2011; Leitch et al., 2010). Средний размер генома покрытосеменных растений составляет 5 800 Мпн (у однодольных- 10 200 Мпн; у двудольных- 2 800 Мпн) (Рис. 8).

Средняя длина гена (за исключением длины интронов) у эукариот около 1 300 пн (с небольшой вариацией между таксонами) (Xu et al., 2006), тогда как число генов у диплоидных высших растений - около 30 000 (Ming et al., 2008), что в целом составляет 40 Мпн. Если к этому добавить структурные районы хромосом (центромеры и теломеры), рДНК, регуляторные последовательности и интроны, то получим оценку ~ 60 Мпн, сопоставимую с минимальным размером генома. Большинство известных видов растений имеют размер генома, значительно превышающий минимальную границу. Увеличение размера ядерного генома может достигаться за счет мультипликации либо части генома, либо генома в целом (полиплоидизация). Полиплоидия происходила многократно в ходе эволюции растительных видов и была установлена в недавнем эволюционном прошлом у примерно половины изученных видов растений (Schranz et al., 2012). Второй источник разнообразия - это амплификация последовательностей геномной ДНК. Помимо амплификации, в геноме могут происходить делеции как генов (особенно дублированных), так и повторяющихся некодирующих последовательностей, что может отражаться на размере генома. Например, геном *Arabidopsis thaliana* примерно на 50% меньше генома близкородственного вида *A.lyrata*, хотя эти виды разошлись от общего предка сравнительно недавно - ок. 10 млн лет назад (Hu et al., 2011). В этом случае различие в размере генома обусловлено

множественными делециями в некодирующих межгенных районах, насыщенных мобильными элементами. Межвидовая гибридизация довольно часто сопровождается делециями ДНК (Ma and Gustafson, 2008). Изучая эволюцию размера генома в семействе Brassicaceae ученые обнаружили 16-кратные различия среди 185 видов (Lysak et al., 2009). Половина этих видов имели уменьшенный размер генома по сравнению с общим предком, несмотря на динамичные процессы, направленные на увеличение размера генома (транспозиции мобильных элементов и полиплоидизация). До сих пор не установлены общие закономерности и селекционные механизмы, которые лежат в основе вариации размера генома в ту или другую сторону в ходе эволюции растительных видов.

Большинство межвидовых различий в размере генома связаны с содержанием повторяющихся последовательностей ДНК, которое подвержено быстрым изменениям. У кукурузы существуют большие различия по размеру терминального гетерохроматина хромосом, состоящего из тандемных повторов (Aquiar-Perecin and de Vosa, 1985; Laurie and Bennett, 1985). Большая вариация по содержанию гетерохроматина, коррелирующая с размером генома, наблюдается также у ржи, *Secale cereale* ($2n=14$), причем полиморфизм затрагивает даже гомологичные хромосомы (Alkhimova et al., 2004). При некоторых условиях повторяющиеся последовательности ДНК терминальных районов хромосом теряются в ходе митоза. Была показана ограниченная вариабельность размера генома у диплоидных и тетраплоидных видов пшеницы, связанная с активностью ретроэлементов (Ozkan et al., 2010). У льна обнаружены изменения числа копий генов рРНК в результате различных стрессовых воздействий (Cullis, 2005). У кукурузы количественные изменения затрагивают все концевые районы хромосом, в которых происходят интенсивные реорганизации (инсерции, дупликации и делеции) отдельных сегментов размером более 1 тпн (Belo et al., 2010). Такой полиморфизм, по-видимому, имеет важное значение для популяций

видов как животных, так и растений, для их адаптации, устойчивости к стрессу и для гетерозиса (Biemont, 2008; Belo et al., 2010).

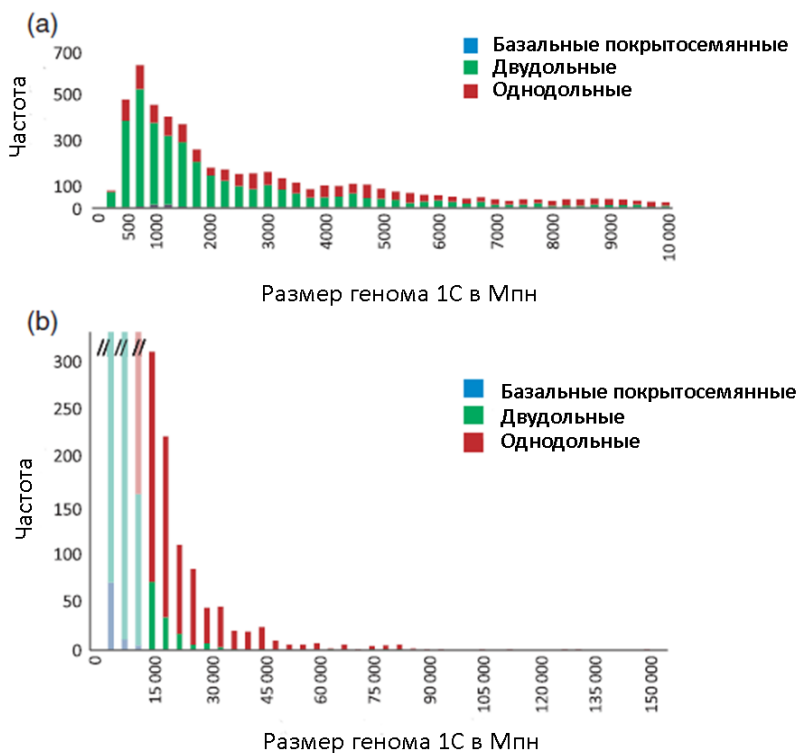


Рис. 8 Размер генома у покрытосеменных растений. (а) до 10 000 Мпн; (б) от 15 000 до 150 000 Мпн ([http:// data.kew.org/cvalues/](http://data.kew.org/cvalues/))

1.2.1.2. Кодирующие последовательности ДНК

Первым проанализированным на уровне ДНК геномом высших растений был геном арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* ($2n=10$) (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Он относится к маленьким геномам, размер его гаплоидного генома составляет 157 Мпн. Общее число генов составляет 27 000, что примерно соответствует числу генов у таких организмов, как человек и мышь (Lander et al., 2001), однако, размеры генома в 25-30 раз меньше. С этим обстоятельством связаны важные особенности в структуре отдельных генов арабидопсиса и общей структуры его генома. Гены арабидопсиса компактны, содержат лишь несколько экзонов, разделенных короткими (около 250 пн) интронами. Промежутки между отдельными генами составляют в среднем 4.6 тпн. Для сравнения, гены человека содержат многие десятки и даже сотни экзонов и интронов, а

межгенные участки имеют размеры от 10 тпн и более (Lander et al., 2001). Функции 69% генов были классифицированы согласно сходству с белками различных организмов с установленной функцией (Рис. 9а). Примерно 30% из всех проанализированных продуктов генов составляют белки, специфичные для растений, а также белки с неустановленной функцией. В целом, значительная часть белков арабидопсиса проявляет сходство с соответствующими продуктами других эукариотических организмов, таких как дрожжи, дрозофила и человек (Рис. 9б). Только 8-23% белков арабидопсиса, отвечающих за транскрипцию, имеют сходство с аналогичными продуктами других эукариот, что указывает на независимую эволюцию транскрипционных факторов у растений. Наблюдается относительно высокий уровень сходства между белками арабидопсиса и бактерий, ответственными за метаболизм и энергетический обмен, что отражает высокий консерватизм структуры этих белков в ходе эволюции. И, наконец, сравнение генов, вовлеченных в межклеточное взаимодействие и передачу сигналов, выявило их структурную дивергенцию относительно одноклеточных организмов (Рис. 9б). Особенностью генома арабидопсиса, как и большинства других растений, является относительно большое количество дублированных генов. Предполагают, что дубликации происходили либо в результате неравного кроссинговера (локальные дубликации), либо в результате событий полиплоидизации, которые происходили 50-200 млн лет назад (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Vision et al., 2000).

В целом, с использованием модели арабидопсиса было показано, что наряду со сходными для всех эукариот семействами белков, существует порядка 150 уникальных для растений семейств, которые включают транскрипционные факторы, структурные белки, ферменты и белки с неизвестной функцией. Семейства общих для эукариот генов в ходе дивергенции растений подвергались значительным количественным изменениям (делециям или амплификациям), что связано с большей

изменчивостью размера генома у растений, по сравнению с другими эукариотами (Bennett and Leitch, 2011).

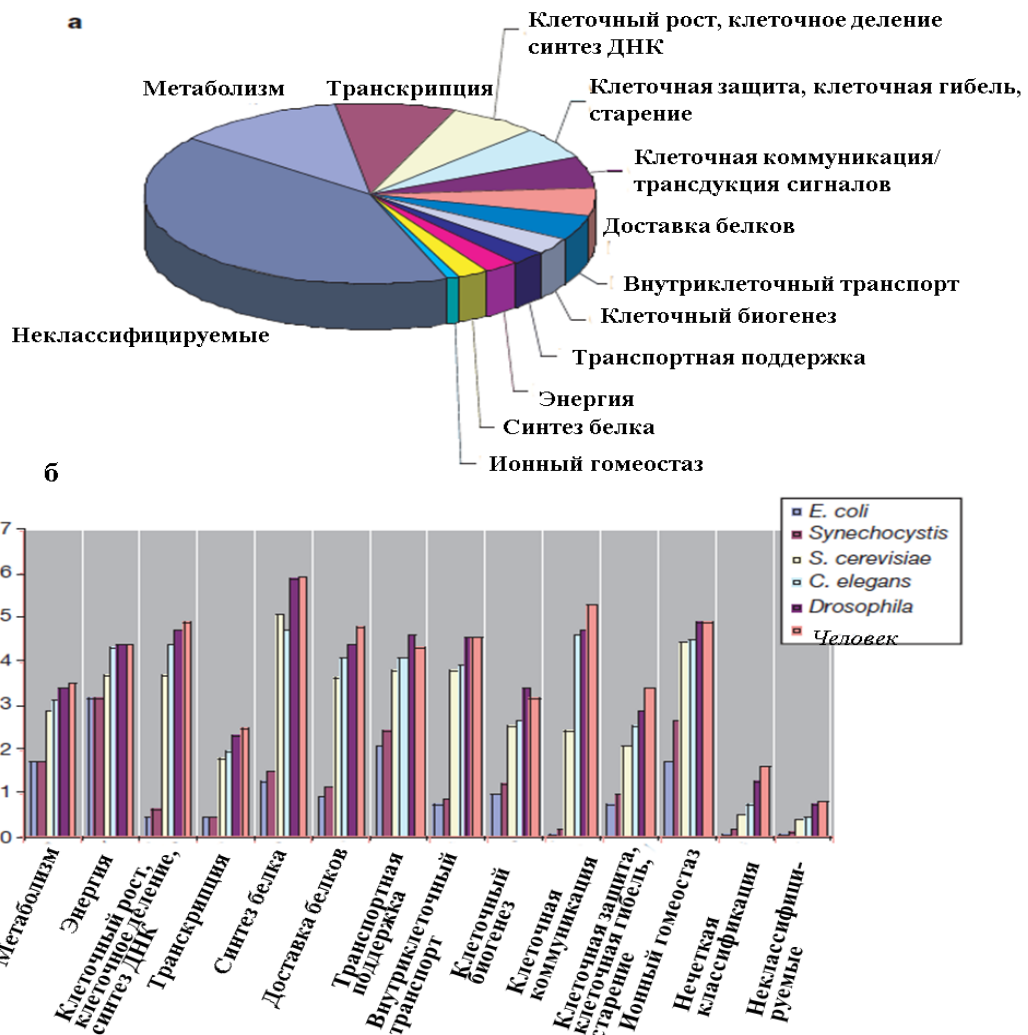


Рис. 9 Функциональный анализ генов арабидопсиса. (а) относительное содержание предполагаемых генов различных функциональных категорий; (б) Сравнение функциональных категорий генов между отдельными эукариотами. По оси У- показатель сходства белков арабидопсиса с соответствующими белками других (референсных) геномов, или процент гомологичных белков с $E \leq 10^{-30}$ (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Еще одним объектом полного секвенирования ДНК стал рис *Oryza sativa* ($2n=24$) (Sequencing Project International Rice, 2005). Гаплоидный геном этого растения в 3.5 раза больше, чем у арабидопсиса (450 Мпн). Количество генов у риса составляет 57-62.5 тыс. (Feng et al., 2002). Таким образом, геном риса содержит приблизительно в два раза больше генов, чем геном

арабидопсиса и человека, что может отражать его полиплоидное происхождение (Lander et al., 2001).

Геномы риса и арабидопсиса являлись основными референсными геномами для анализа генетического содержания всех других растительных объектов. Сравнительный анализ генетических карт хозяйственно-ценных злаковых растений выявил высокий уровень их коллинеарности (синтении), а именно, консервативный порядок расположения генов на хромосомах (макроколлинеарность). Это явление было отмечено для таких видов растений как рис, кукуруза, сорго, сахарный тростник, пшеница и др. (Gale and Devos, 1998). Синтения генов поддерживалась в ходе эволюции, несмотря на значительные изменения размера генома и продолжительное время дивергенции указанных видов (60 млн лет). Более детальный анализ структуры ген- содержащих районов обнаружил ряд нарушений коллинеарности, связанных с геномными перестройками на уровне отдельных кластеров генов, такими как инсерции, делеции или дубликации генов (Gaut and Doebley, 1997; Song et al., 2002; Bancroft, 2000). Частичный сравнительный анализ геномных последовательностей различных злаковых растений выявил основной принцип организации генома: чередование рекомбинационно- активных районов, обогащенных генами («генные островки») и районов высокоповторяющейся ДНК, насыщенных, как правило, мобильными элементами. В дивергенции генов у злаковых большую роль играли дубликации, однако, при этом сохранялась макроколлинеарность хромосом (Ware and Stein, 2003).

Недавно, двумя группами исследователей были представлены черновые последовательности аллогексаплоидного генома мягкой пшеницы *T. aestivum* (Brenchley et al. 2012; Mayer et al. 2014). Было идентифицировано ок. 124 тыс. генов, что примерно в 2 раза превышает число генов у риса (см. выше). Большая часть этих генов была ассоциирована с А-, В- и D-субгеномами. Карты синтении высокого разрешения позволили выявить множественные нарушения консервативного порядка гена, что

свидетельствует о высоко- динамичном состоянии гексаплоидного генома. Сопоставление с приблизительным суммарным набором генов диплоидных предшественников позволило установить редукцию в ходе аллополиплоидизации 10- 16 тыс. генов. Следует отметить, что этот масштаб редукции все же значительно уступает масштабу редукции генов у кукурузы (Schnable et al., 2011) и *Brassica rapa* (Mun et al., 2009), что, однако, можно объяснить более молодым возрастом мягкой пшеницы, по сравнению с вышеназванными полиплоидами. Также необходимо отметить, что редукции подверглись не все классы генов; большинство генов, кодирующих транскрипционные факторы сохранили свое функциональное состояние в каждом из субгеномов, что указывает на консервацию специфических для субгеномов генных сетей, обеспечивающую неаддитивную экспрессию генов и пластичность паттернов экспрессии в зависимости от окружающих условий (Pumprey et al. 2009). Некоторые семейства генов, такие как гены роста, энергетического метаболизма, гены защиты от внешних воздействий, гены, отвечающие за состав питательных компонентов растения, гены, кодирующие рибосомные белки, запасные белки и т.д., напротив, представлены в большем количестве у мягкой пшеницы, по сравнению с диплоидными геномами. Эти гены могут быть связаны с продуктивностью и подвергаться искусственному отбору.

1.2.1.3. Тандемно-организованные ПП ДНК

Первые представления о тандемно-организованных повторах были получены при изучении сателлитной ДНК. Сначала этим термином обозначали ту часть генома, которая отделялась при градиентном ультрацентрифугировании (Kit, 1961) и, следовательно, по плотности и по содержанию АТ/ГС пар должна была отличаться от основной массы ДНК. В настоящее время под этим термином подразумевается характерный компонент эукариотического генома, состоящий из тандемно-

организованных повторов. Сателлитная ДНК не кодирует белки и локализована в конститутивном гетерохроматине хромосом. (см. обзор: Хемлебенб и др., 2003). Сателлитная ДНК состоит из рядов идентичных повторяющихся единиц (мономеров), число которых может варьировать от нескольких сот до более миллиона. В зависимости от размера повторяющихся единиц различают микросателлитную, минисателлитную и сателлитную ДНК. Микросателлиты (SSR; simple sequence repeats) имеют длину мономера не более 6 пар нуклеотидов, тогда как у минисателлитов длина мономера чаще всего колеблется в пределах 10-100 пн, а у сателлитов - 100-400 пн (Zhao and Ganai, 1996; Sharma and Raina, 2005). В геномах пшеницы и ячменя микросателлитная ДНК составляет 1,2% и 3,8%, соответственно, и в основном представлена короткими высокоповторяющимися последовательностями: $(GAA)_n(GAG)_m$ (Mitra and Bhatia, 1986). Микросателлитные повторы имеют, главным образом, интерстициальное расположение на хромосомах и широко используются в качестве маркеров для построения молекулярно-генетических карт, в частности, мягкой пшеницы (Bryan et al., 1997; Pestsova et al., 2000a; Roeder et al., 1998). Для сателлитной ДНК характерно более локализованное распределение на концах хромосом или в центромерных районах. Так, например, протяженные тандемные повторяющиеся единицы входят в состав теломерного гетерохроматина ржи *Secale cereale*, составляя 8-12% генома (Bedbrook et al., 1980). Были детально исследованы четыре семейства теломерных повторов ржи, имеющих сложную иерархическую структуру. Основным является семейство pSc119.2 с повторяющимся элементом 120 пн, первоначально выделенное из *Secale cereale* и впоследствии обнаруженное у многих видов трибы Triticeae и сестринской трибы Avenae (Vershinin et al., 1995; Bedbrook et al., 1980; McIntyre et al., 1990; Salina et al., 1998). Повторяющиеся единицы остальных семейств содержат простые субповторы длиной 120 пн в сочетании с другими последовательностями (Bedbrook et al., 1980).

Из генома *Aegilops speltoides* было выделено видоспецифичное семейство теломерных повторов Spelt1, составляющее около 2% ядерной ДНК данного вида (Salina et al., 1998). Указанные повторы длиной 178 пн входят в состав теломерных районов хромосом наряду с более общим для злаков семейством Spelt52, при этом повторы Spelt1 расположены дистально (Salina et al., 2006). Семейство Spelt52 содержит мономеры двух типов Spelt52.1 и Spelt52.2, которые имеют одинаковую консервативную часть длиной 283 пн и негомологичные участки длиной 92 и 106 пн, соответственно (Salina et al., 2004).

Помимо уже указанных, у представителей трибы Triticeae был найден ряд других семейств тандемных повторов, имеющих теломерную (или центромерную) локализацию:

а) *Afa* (pAs1)-семейство повторов длиной 340 пн, которые локализованы в теломерных и интерстициальных хромосомных районах *Ae. tauschii*, *T. aestivum*, видов *Hordeum*, *Elymus trachycaulus* (Rayburn and Gill, 1986; Nagaki et al., 1995; Nagaki et al., 1998). К этой же группе можно отнести семейство тандемно-организованных последовательностей pAesKB52, расположенных в теломерных районах хромосом у некоторых видов Triticeae, относящихся к S-геному (*Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, и *Ae. longissima*) (Anamthawat-Josson and Heslop-Harrison, 1993; Zhang et al., 2002; Salina et al., 2004);

б) семейство *TaiI*, состоящее из тандемных повторов длиной 570 пн, обнаруженных в теломерных районах большинства видов Triticeae, за исключением видов *Triticum* и *Aegilops*, у которых выявлено центромерное расположение указанных повторов (Kishii et al., 2001);

в) центромер-специфичный тандемный повтор *CentC* кукурузы *Zea mays* длиной 156 пн (Ananiev et al., 1998).

г) *HvRT* теломерные повторы *Hordeum vulgare* с длиной мономера 118 пн, имеющие сложную иерархическую организацию (Kilian and Kleinhofs, 1992).

Тандемные повторы могут распространяться по геному посредством неравного кроссинговера между парами сестринских хроматид или гомологичных хромосом (Charlesworth et al., 1994), а также с помощью репликации экстрахромосомной ДНК по модели «катящегося колеса» (Navratilova et al., 2008).

1.2.1.4. Диспергированные ПП ДНК

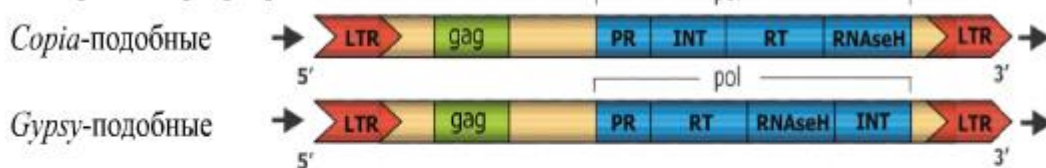
Известно, что основная масса диспергированных повторов возникла в результате активности мобильных элементов (МЭ). МЭ генома подразделяют на два класса: элементы класса I (ретротранспозоны), которые перемещаются с помощью механизма «копирования-встраивания» с использованием РНК-интермедиатов, и элементы класса II (ДНК-транспозоны), которые используют механизм «вырезания-встраивания», с образованием либо одно-, либо двухцепочечных разрывов ДНК (Рис. 10) (Wicker et al., 2007).

Класс I, ретротранспозоны

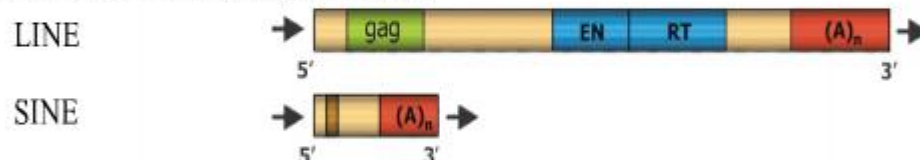
Согласно общепринятой классификации, по наличию-отсутствию длинных концевых повторов (LTR) ретротранспозоны делятся на LTR-содержащие (LTR ретротранспозоны) и не содержащие LTR. Последние, в свою очередь, делятся на длинные диспергированные (*LINE*) и короткие диспергированные (*SINE*) элементы (Рис. 10). Кроме этих основных групп выделяют дополнительные группы: *DIRS*- и *Penelope*-подобные элементы, а также неавтономные варианты LTR-ретротранспозонов: *TRIM*- (Terminal-Repeat Retrotransposons In Miniature) и *LARD*-элементы (Large Retrotransposon Derivatives) (см. обзор Сергеева и Салина, 2011).

Класс 1. Ретротранспозоны

LTR-содержащие ретротранспозоны



LTR-несодержащие ретротранспозоны



Класс 2. ДНК-транспозоны

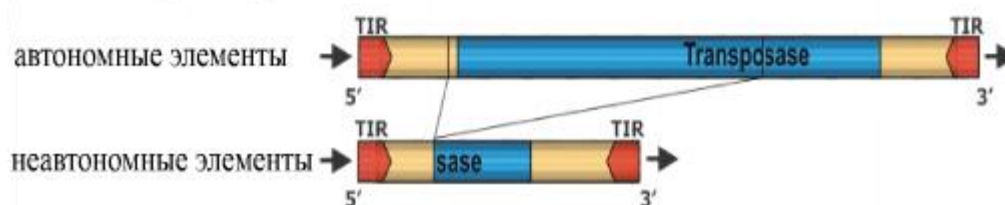


Рис. 10 Основные группы мобильных элементов (Wicker et al., 2007).

Выделяют два основных суперсемейства LTR-ретротранспозонов: *Gypsy* и *Copia*, различающихся порядком расположения генов обратной транскриптазы и интегразы друг относительно друга, но имеющих одинаковый механизм транспозиции (Wicker et al., 2007). У растений LTR-ретротранспозоны являются преобладающей группой МЭ. Они составляют от 15% генома у *Arabidopsis thaliana* до 90%- у некоторых представителей *Liliaceae* (Flavell et al., 1992; Voytas et al., 1992; Bennetzen, 1996; SanMiguel, 1996; Suoniemi et al., 1998; Kumar and Bennetzen, 1999; Vicient et al., 2001; Vitte and Panaud, 2005; Vitte and Bennetzen, 2006; Sabot and Schulman, 2006). Длина этих элементов варьирует от нескольких тпн до 25 тпн, а размер LTR-от нескольких сотен пн до нескольких тпн. LTR ограничены инвертированными динуклеотидами TG/CA и содержат промотор с энхансером, а также сайт полиаденилирования. При интеграции LTR ретротранспозоны образуют дупликацию сайта-мишени (TSD) длиной 4-6 пн. Внутренняя

область LTR ретротранспозонов содержит 2 ОРС: GAG- для структурного белка вирусоподобных частиц и POL, кодирующую аспарагиновую протеиназу (PR), обратную транскриптазу (RT), РНК-азу H (RH) и интегразу (INT) (Рис. 10). LTR ретротранспозоны также содержат специальные сигналы для упаковки, димеризации, обратной транскрипции и интеграции. Растения с большими геномами, такие как: кукуруза, пшеница, ячмень, могут содержать тысячи семейств LTR-ретротранспозонов. Однако в каждом геноме основную массу диспергированных повторов ДНК составляют, как правило, несколько или даже одно семейство ретротранспозонов, например, *BARE1* у ячменя (Vicient et al., 1999), *Opie* у кукурузы (SanMiguel et al., 1998).

В настоящий момент нет точных данных о содержании *LINE*-элементов в геномах растений из-за сложности их идентификации, однако, по видимому, они составляют гораздо меньшую часть генома в сравнении с LTR ретротранспозонами (Сергеева и Салина, 2011). Выделяют пять основных суперсемейств: *R2*, *L1*, *RTE*, *I* и *Jockey*. Автономные *LINE* элементы кодируют, по меньшей мере, RT и эндонуклеазу (EN) в одной рамке считывания (POL), необходимые для транспозиции (Ostertag and Kazazian, 2005) (Рис. 10). У некоторых представителей *LINE* выявлена GAG-подобная ORC с 5'-конца от POL, однако, ее функция еще не ясна. Хотя *LINE* и образуют TSD в результате транспозиции, редуцированные 5'-концы делают их сложными для определения. Редукция, возможно, является результатом преждевременной терминации обратной транскрипции (Petrov and Hartl, 1998). На 3'-конце *LINE* могут содержать поли(A)-хвост, tandemный повтор или A-богатый район. Таким образом, *LINE* элементы более разнообразны по своей структуре, чем LTR ретротранспозоны. К наиболее известным растительным *LINE* элементам относятся представители суперсемейств *L1* и *RTE* (Zupunski et al., 2001).

В качестве специфических представителей класса ретротранспозонов недавно были описаны *DIRS*-подобные элементы (Goodwin and Poulter,

2004). Эти элементы содержат ген тирозиновой рекомбиназы вместо гена интегразы и не образуют TSD. Их концы имеют сходство с несимметричными прямыми или инвертированными повторами. Эти особенности указывают на особый механизм интеграции, отличный от такового у LTR-ретротранспозонов и *LINE* элементов. Тем не менее, из-за наличия RT они отнесены к ретротранспозонам. Представители этой группы обнаружены в различных видах: от зеленых водорослей и грибов до млекопитающих (Goodwin and Poulter, 2004).

SINE элементы формально отнесены к классу 1, хотя имеют другое происхождение. Это неавтономные элементы, но они не являются делеционными производными других ретротранспозонов. В отличие от ретропроцессированных псевдогенов, они содержат внутренний промотор. *SINE* элементы перемещаются пассивно, под действием белковых факторов, кодируемых *LINE* элементами (RT) (Kramerov and Vassetzky, 2005; Kajikawa and Okada, 2002). Длина *SINE* элементов составляет 80-500 пн. Они образуют TSD (5-15 пн). «Голова» или передняя часть *SINE* содержит промотор для РНК полимеразы III и определяет суперсемейство *SINE* элемента, в зависимости от его происхождения: тРНК, 7SL РНК и 5S РНК. Внутренние районы *SINE* элементов (50-200 пн) семейство-специфичны и имеют различное происхождение, иногда могут быть результатом димеризации или тримеризации *SINE* элементов. Источник 3'-района обычно неясен (иногда это укороченный *LINE*-элемент). Он может быть АТ-богатым, содержать 3-5-пн тандемные повторы или содержать поли(Т)-хвост, сигнал терминации (Kramerov and Vassetzky, 2005).

Класс II, ДНК транспозоны

ДНК транспозоны, как и ретротранспозоны, обнаружены почти у всех эукариот. Они обычно представлены в небольшом количестве, тем не менее, некоторые, как например, *Pogo-Fot1* (Daboussi and Caru, 2003) у грибов или *CASTA* у пшеницы (Wicker et al., 2003) распространились более успешно.

Класс II содержит два подкласса: первый объединяет элементы, которые перемещаются с помощью классического механизма «вырезания–встраивания» с образованием двухцепочечного разрыва ДНК, а второй подкласс использует для перемещения механизм «катящегося кольца» (Сергеева и Салина, 2011).

Подкласс 1 содержит классические мобильные элементы, характеризующиеся наличием концевых инвертированных повторов (TIR) переменной длины (Рис. 10). Транспозиция осуществляется с помощью белка транспозазы, который узнает концевые инвертированные повторы и разрезает обе цепи на обоих концах элемента. TIR-содержащие ДНК-транспозоны представлены надсемействами *hAT*, *Tc-Mariner*, *Mutator (MULU)*, *P*, *PIF-Harbinger* и *CASTA* (Wicker et al., 2007). Наиболее подробно изученные *hAT*-семейства- *Ac-Ds*-элементы кукурузы и *Tam3* львиного зева (Rubin et al., 2001). Суперсемейство *PIF-Harbinger* предпочтительно встраивается рядом с TAA-мотивом. Эти мобильные элементы содержат две ОРС: одна кодирует ДНК-связывающий белок, другая — транспозазу (Jurka and Kapitonov, 2001).

CASTA-элементы имеют характерную структурную черту: на внешних концах TIR присутствует консервативный мотив *CASTA*. Наиболее хорошо изученным является *CASTA*-транспозон семейства *Spm (Suppressor-Mutator)* кукурузы (Frey et al., 1990). Члены суперсемейства *CASTA* несут транспозазу и ОРС с неизвестной функцией. У растений короткие TIR ограничены высококонсервативными *CASTA*- (иногда- *CASTG*)-мотивами и фланкированы TSD длиной 3 пн (Табл. 1). TIR обычно фланкируют сложные массивы субтерминальных повторов (Wicker et al., 2003).

К подклассу 1 принадлежит многочисленная и гетерогенная группа неавтономных элементов *MITE* (Miniature Inverted-Repeat Transposable Element) (Сергеева и Салина, 2011). Эти элементы имеют размер от нескольких десятков до нескольких сотен пн. Размер TIR весьма переменчив и составляет от нескольких десятков до нескольких сотен пн. *MITE* элементы

образуют TSD длиной 9-11 пн. Основываясь на нуклеотидной последовательности TIR, *MITE* разделяют на два больших надсемейства: *Stowaway*-подобные и *Tourist*-подобные элементы. В геномах растений эти элементы часто расположены рядом с генами (Bureau, Wessler, 1992; 1994).

Подкласс 2 содержит мобильные элементы, процесс транспозиции которых влечет за собой репликацию без двунитевых разрывов, чем резко отличается от подкласса 1. Эти мобильные элементы перемещаются путем репликации, приводящей к перемещению только одной цепи. С подклассом 1 их связывает только признак отсутствия РНК-интермедиатов, но не наличие общих предков (Wicker et al., 2007). Подкласс 2 в геномах растений представлен элементами суперсемейства *Helitron*, которые хорошо описаны в геноме кукурузы (Kapitonov and Jurka, 2001). Концы этих элементов не содержат TIR, но имеют TC или CTRR мотивы (где R — пурин). Автономные элементы *Helitron* кодируют тирозиновую рекомбиназу Y2-типа с геликазным доменом и способностью к инициации репликации. Также они могут кодировать белки, связывающие одноцепочечную ДНК, или другие белки (Kapitonov and Jurka, 2001). Любопытно, что многие *Helitron*-элементы несут случайно захваченные фрагменты генов хозяина. Хотя эти мобильные элементы были описаны в основном для растений, они также найдены у животных и грибов (Poulter and Goodwin, 2005).

Некоторые группы ДНК-транспозонов остаются неклассифицированными, поскольку для них известны последовательности только неавтономных вариантов. Такую группу малоизученных МЭ представляют *Foldback*- FB- элементы, сходные с одноименным элементом *Drosophila melanogaster*. Эти элементы представлены в широком ряду организмов, в том числе и растений- у риса *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, ржи *Secale cereale*, пасленовых Solanaceae (Feschotte and Pritham, 2007).

Табл. 1 Классификация мобильных элементов и их распространенность у разных групп организмов (по Wicker et al., 2007).

Классификация		Структура	TSD	Распространенность
Порядок	Суперсемейство			
Класс 1 — ретротранспозоны				
LTR	Copia	→ GAG AP INT RT RH →	4-6	P, Г, М, О
	Gypsy	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	P, Г, М, О
	Bel-Pao	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	М
	Retrovirus	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	М
	ERV	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	М
DIRS	DIRS	→ GAG AP RT RH YR ←	0	P, Г, М, О
	Ngaro	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	М, Г
	VIPER	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	О
PLE	Penelope	← RT EN →	вар.	P, Г, М, О
LINE	R2	— RT EN —	вар.	М
	RTE	— APE RT —	вар.	М
	Jockey	— ORF1 — APE RT —	вар.	М
	L1	— ORF1 — APE RT —	вар.	P, Г, М, О
	I	— ORF1 — APE RT RH —	вар.	P, Г, М
SINE	tRNA	— — — — —	вар.	P, Г, М
	7SL	— — — — —	вар.	P, Г, М
	5S	— — — — —	вар.	М, О
Класс 2 — ДНК-транспозоны. Подкласс 1				
TIR	Tc1-	→ Tase* ←	ТА	P, Г, М, О
	Mariner	→ Tase* ←		
	hAT			
	Mutator	→ Tase* ←		
	Merlin	→ Tase* ←		
	Transib	→ Tase* ←		
	P	→ Tase ←		
	PiggyBac	→ Tase ←		
	PIF-Harbinger	→ Tase* — ORF2 ←		
CACTA	→ Tase — ORF2 → → →			
Crypton	Crypton	— YR —	0	Г
Класс 2 — ДНК-транспозоны. Подкласс 2				
Helitron	Helitron	— RPA // Y2 HEL —	0	P, Г, М
Maverick	Maverick	→ C-INT — ATP // CYP — POL B ←	6	Г, М, О

→ LTR, длинный концевой повтор; [] кодирующая область; — некодирующая область;

→ ← TIR, концевые инвертированные повторы

— — — — — диагностические особенности в некодирующей области;

— // — район, содержащий одну или более дополнительную ORF;

AP – аспарагиновая протеаза;

ENV – белок оболочки;

POL B – ДНК-полимераза B;

Tase – транспозаза (* – с DDE-мотивом);

APE – апуриновая эндонуклеаза;

GAG – капсидный белок;

RH – РНК-аза H;

ATP – упаковочная АТФ-аза;

HEL – геликаза;

P – растения; Г – грибы; М – Metazoa; О – остальные организмы.

RPA – репликативный белок А (только у растений);

YR – тирозиновая рекомбиназа;

C-INT – C-интеграза;

CYP – цистеиновая протеаза;

ORF – открытая рамка считывания с неизвестной функцией;

RT – обратная транскриптаза;

Y2 – YR с YY-мотивом;

EN – эндонуклеаза.

1.2.2. Хромосомная организация генома высших растений

Размер хромосомы является специфической характеристикой каждого вида. Отдельные хромосомы могут содержать от менее чем 20 Мпн до более чем 900 Мпн ДНК в каждой хроматиде и если нить ДНК распрямить, то ее полная длина составляла бы 7-300 мм (Heslop-Harrison and Schwarzscher, 2011). Молекула ДНК тесно связана с ядерными белками-гистонами; участок ДНК длиной 146 пн дважды оборачивается вокруг октамерного комплекса гистонов-нуклеосомы, включающего четыре различных гистона: H2a, H2b, H3 и H4 (Тейф и др., 2011). Промежуток ДНК между отдельными нуклеосомами длиной 10-100 пн связан с молекулой гистона H1 (спейсерный гистон). За последнее десятилетие накопилось много данных, демонстрирующих важную роль гистонов в регуляции генетической экспрессии и показано, что эти белки подвергаются многочисленным пост-трансляционным модификациям (метилование, ацетилирование, фосфорилирование и др.), влияющим на структуру хроматина, а значит и эффективность транскрипции генов (Martin and Zhang, 2005; Kouzarides, 2007). Упаковка двойной спирали ДНК в нуклеосомы- первичный уровень, на основе которого формируются уровни упаковки (волокна) более высокого порядка: вторичные, третичные и тд (Fransz and deJong, 2011). В настоящий момент не ясно- как формируются эти уровни, соответствует ли структура хроматина после различных обработок нативной структуре и какие последствия для репликации, транскрипции и других генетических процессов имеют те или иные уровни укладки ДНК.

У большинства видов хромосомы имеют три основные структурные особенности, видимые цитологически: теломеры на концах хромосом, центромера или первичная перетяжка и у некоторых хромосом внутри отдельного набора- вторичная перетяжка в ядрышко-образующем районе (NOR) (Рис. 11). По положению первичной перетяжки различают метацентрические, телоцентрические и акроцентрические хромосомы.

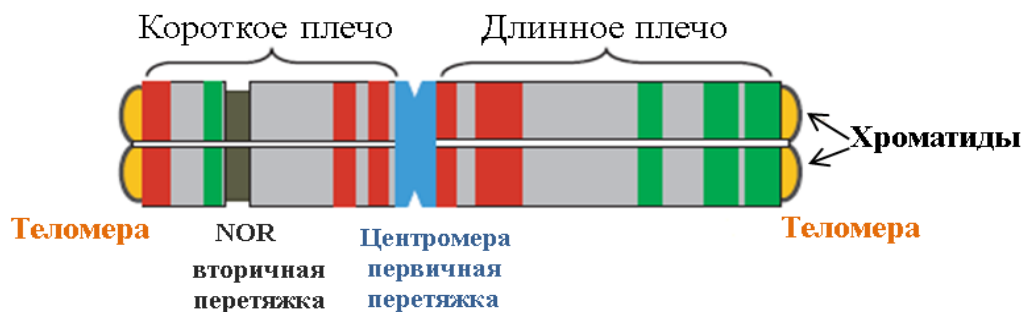
Набор хромосом вида, распределенных в зависимости от размера (физической длины) и позиции центромеры называется кариотипом.

1.2.2.1. Теломеры и субтеломерные районы

Теломерные участки хромосом характеризуются отсутствием способности к соединению с другими хромосомами или их фрагментами и выполняют функцию защиты хромосомы от деградации. У большинства эукариот теломеры состоят из специализированной линейной хромосомной ДНК, состоящей из коротких tandemных повторов. В теломерных участках хромосом ДНК вместе со специфически связывающимися с теломерными ДНК-повторами белками образует нуклеопротеидный комплекс-конститутивный (структурный) теломерный гетерохроматин. Теломерные повторы весьма консервативны, например, повторы всех позвоночных состоят из шести нуклеотидов TTAGGG, повторы всех насекомых- TTAGG, повторы большинства растений- TTTAGGG (Sykorova et al., 2003a; 2003b). Было установлено, что критическая длина человеческой теломеры, при которой хромосомы начинают соединяться друг с другом, составляет 12,8 теломерных повторов (Carper et al., 2007). На модельном растительном объекте *A.thaliana* было показано, что репликация теломерных концов, несущих повтор $(TTTAGGG)_n$ происходит не полуконсервативным способом, как у остальной ДНК, а с участием фермента теломеразы (Richards and Ausubel, 1988). Данный фермент при помощи собственной РНК-матрицы достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры, укорачивающиеся с каждым клеточным циклом в результате недорепликации (Fajkus et al., 2005; Watson and Riha, 2010). Указанный механизм обуславливает вариабельность числа копий теломерных повторов не только между видами, но и между различными клетками и хромосомами внутри одного ядра (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 1991).

Субтеломерные участки хромосом примыкают к теломерам, и выполняют ряд важных функций: отвечают за позиционирование хромосом

в интерфазе, оказывают влияние на их поведение в митозе и мейозе (Louis, 1995; Feldman et al., 1997). На настоящий момент детально охарактеризована структура субтеломерных участков хромосом риса *Oryza sativa* (Yang et al 2005), пшеницы (Salina et al., 2006; Sergeeva et al 2010) и *A. thaliana* (Kuo et al 2006). Субтеломерные районы хромосом этих видов имеют ряд характерных особенностей, таких как наличие множественных сегментальных дупликаций, присутствие хромосом-специфичных тандемных повторов и мобильных элементов, а также генов. Что касается видов злаковых (Poaceae), то у них субтеломерные районы содержат различные семейства высокоповторяющихся тандемных повторов ДНК, которые часто являются видоспецифичными и геном-специфичными в аллополиплоидном геноме (Jones and Flavell, 1982; Ohtsubo et al., 1991; Wu and Tanksley, 1993; Vershinin et al., 1995; Salina et al., 2006). Эти повторы чередуются с дисперсными уникальными и низко-копийными последовательностями ДНК, образуя специфичные комбинации на концах хромосом (Sykorova et al., 2003; Alkhimova et al., 2004).



Хромосомные районы: Перикаентрический Интеркалярный Субтеломерный
(перикаентромерный) интерстициальный терминальный
парацентрический (парацентромерный)

Рис. 11 Схема организации метафазной хромосомы растений (по Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011).

Районы эухроматина- светло-серые полосы; имеют повышенную частоту рекомбинаций в ходе мейоза и обогащены транскрипционно-активными генами,

которые перемежаются с мобильными диспергированными генетическими элементами.

Районы гетерохроматина- красные и зеленые полосы; обогащены высокоповторяющимися тандемными последовательностями ДНК и иногда мобильными элементами; характерно отсутствие рекомбинаций и низкое содержание генов, которые зачастую транскрипционно-неактивны.

NOR- район ядрышкового организатора; содержит длинные ряды повторяющихся генов, кодирующих 18S-5.8S-26S субъединицы рибосомальной РНК (рРНК) и разделенных межгенными спейсерами. Большинство геномов имеют несколько крупных и минорных рДНК локусов. В интерфазном ядре эти локусы образуют ядрышки, благодаря экспрессии рРНК генов; в метафазных хромосомах они цитологически видны как вторичные перетяжки из-за деконденсированного состояния.

Субтеломерные или теломер-ассоциированные последовательности (TAS; telomere associated sequences) обычно представлены длинными тандемными повторами, которые являются видо- и зачастую хромосом-специфичными.

Теломеры- ряды коротких консервативных повторов (TTTAGGG)_n; необходимы для стабилизации и репликации концов хромосом.

Центромера- на цитологических препаратах видна как перетяжка или щель, разделяющая два плеча хромосомы. В ходе деления ассоциируется с кинетохором, к которому прикрепляются микротрубочки веретена. Характеризуется специфическими центромерными гистонами. ДНК последовательности центромеры не являются консервативными. Район с обеих сторон прилегающий к центромере- парацентромерный содержит длинные ряды тандемных повторов и мобильные элементы.

1.2.2.2. Центромера

Центромеры- это хромосомные структуры, ответственные за направление движения хромосом во время митоза. К функциям центромер относятся адгезия сестринских хроматид, образование кинетохора, спаривание гомологичных хромосом. Центромеры у большинства растений содержат протяженные ряды тандемных повторов (Maluszynska and Heslop-Harrison, 1991; Brandes et al., 1997; Heslop-Harrison et al., 1999), а также последовательности ретротранспозонов (Gindullis et al., 2001; Wolfgruber et al., 2009). Было показано присутствие в центромерах активно-транскрибируемых генов (Jiang et al., 2003; Yan et al., 2006; Mutti et al., 2010). Несмотря на консервативность белков кинетохора, а также гистона H3 (CenH3), входящего в состав специфической нуклесомной структуры центромеры в метафазе, повторяющиеся последовательности ДНК в центромерном районе

высоко- вариабельны между различными видами (Ma et al., 2004). Было установлено, что в основе формирования и функции активных центромер лежит эпигенетический механизм, независимый от последовательности ДНК (Рис. 12) (Jiang et al., 2003; Carroll and Straight, 2005; Morris and Moazed, 2007).

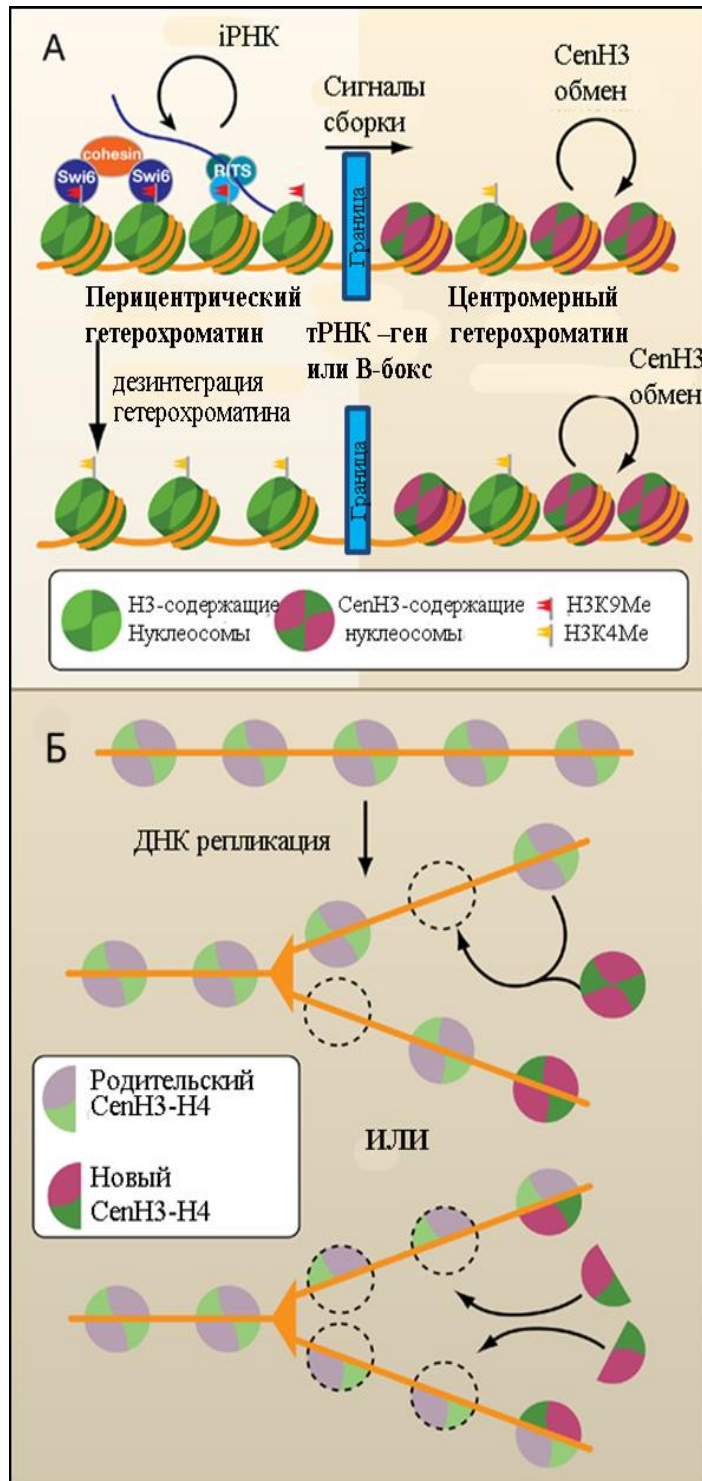


Рис. 12 Формирование и поддержание центромеры у дрожжей (Morris and Moazed, 2007).

(А) Делящиеся дрожжи имеют два самовоспроизводимых хроматиновых домена в районе центромеры: перичентрический гетерохроматин (H3K9-метилированные гистоны; H3K9Me) и CenH3-содержащий центромерный хроматин (H3K4-метилированные гистоны; H3K4Me). Первый домен обеспечивает сигналы сборки для формирования центромеры, которые включают: механизм РНК-индуцируемого транскрипционного сайлесинга (RITS), модификации гистонов (H3K9Me), специфические белки (Swi6 или cohesin) и/или транскрипцию генов т-РНК. Мутации в белках того или другого домена нарушают правильную сегрегацию хромосом, однако, потеря гетерохроматина не влияет на включение CenH3 в функционирующую центромеру.

(Б) Две модели воспроизведения структуры CenH3 хроматина в составе центромер: (1) случайное распределение CenH3-содержащих нуклеосом в ходе ДНК-репликации направляет включение вновь-синтезированных CenH3-содержащих нуклеосом, или (2) случайное распределение CenH3/H4 димеров направляет включение вновь-синтезированных CenH3/H4 димеров.

Наряду с моноцентрическими центромерами, широко распространенными среди растений, были выявлены два неканонических типа центромер. Точечная центромера у пивных дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* представлена последовательностью ДНК длиной 125 пн, которая содержит специфические сайты связывания кинетохора и не имеет какой-либо гомологии с центромерами животных или растений (Morris and Moazed, 2007). Второй неканонический тип центромеры не имеет четкой локализации на хромосоме, однако, обуславливает контакт с микротрубочками на всем протяжении хромосомы (голоцентрический тип). Шесть семейств высших растений (три- однодольных и три- двудольных) имеют голоцентрические хромосомы. В случае ожики (род *Luzula*) было показано, что CenH3 локализуется по всей длине хромосом (Nagaki et al., 2005). Голоцентрическая ассоциация микротрубочек была отмечена также у *Rhynchospora tenuis* ($2n=4$; Cyperaceae) (Guerra et al., 2006). В этом семействе число хромосом варьирует до $2n=200$, причем многие из них имеют размер <10 Мпн, что предполагает процесс хромосомной фрагментации в ходе эволюции. Тем не менее, эти мини-хромосомы сохранили свою способность сегрегировать во время клеточного деления.

1.2.2.3. Локусы рибосомальных генов

Наряду с первичной перетяжкой в области центромеры, у метафазной хромосомы существует вторичная перетяжка в районе организации ядрышка (NOR; nucleolar organizer region) (Рис. 11). Этот район соответствует сайтам локализации генов, кодирующих рРНК, которая считывается в виде единого транскрипта с коэффициентом седиментации 45S. Эта РНК затем подвергается процессингу с образованием 18S, 5.8S и 26S субъединиц рРНК. Тандемно-организованные повторяющиеся единицы рДНК, наряду с цистроном 18S-5.8S-26S рРНК содержат межгенный спейсерный район, в котором локализуется сайт инициации транскрипции для РНК-полимеразы I, сайты инициации и терминации транскрипции рРНК и другие регуляторные

элементы (Рис. 13) (Gerlach and Bedbrook., 1979; Reeder, 1984; Vincentz and Flavell, 1989). Нетранскрибируемый спейсер содержит также ряд повторяющихся нуклеотидных последовательностей, так называемых субповторов А, В, С и D, протяженность и число которых варьирует у разных видов растений; при этом внутри отдельных кластеров длина повторяющейся единицы, как правило, одинаковая (Appels and Dvorak, 1982a; 1982b; Flavell et al., 1986a). У злаков трибы *Triticeae* имеется несколько дискретных локусов рДНК, расположенных на коротких плечах хромосом 1, 5 и 6, каждый из которых содержит ~ 1200 повторяющихся единиц длиной ~ 9 тпн (Flavell and O'Dell, 1976; Gerlach and Bedbrook, 1979). У арабидопсиса локусы рДНК расположены на двух хромосомах с числом копий ~360 единиц/ локус, что в сумме составляет около 5% всего генома (Copenhaver and Pikaard, 1996; Heslop-Harrison and Maluszynska, 1994).

Ядрышки не имеют собственной мембранной оболочки, однако хорошо различимы в интерфазном ядре под световым и электронным микроскопом. В ядрышке происходит синтез рРНК РНК полимеразой I, её процессинг и сборка рибосомных субъединиц в результате объединения 18S, 5.8S и 26S рРНК с 5S рРНК и рибосомальными белками (Carmo-Fonseca et al., 2000). В ядрышке локализуются белки, принимающие участие в этих процессах, часть из которых имеет специфическую последовательность- сигнал ядрышковой локализации (NoLS; Nucleolus Localization Signal) (см. обзор Emmott and Hiscox, 2009). Следует отметить, что самая высокая концентрация белка в клетке наблюдается именно в ядрышках. В этих структурах было локализовано около 600 видов различных белков, причём считается, что лишь небольшая их часть действительно необходима для осуществления ядрышковых функций, а остальные попадают туда неспецифически (Emmott and Hiscox, 2009).

Существуют доказательства, что помимо своей кодирующей функции, ядрышки принимают участие в регуляции клеточного цикла и клеточного

роста и в ответе на стресс (Martindill and Riley, 2008; Mayer and Grummt 2005; Rubbi and Milner 2003; Emmott and Hiscox 2009).

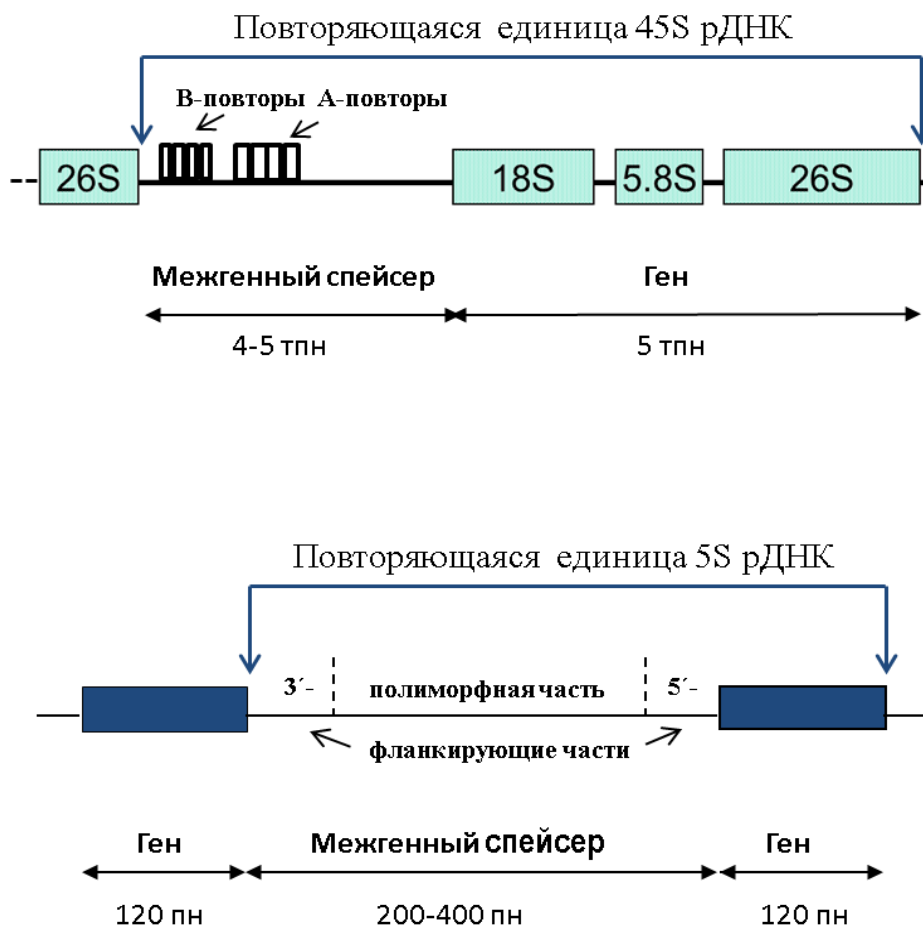


Рис. 13 Организация рибосомальных генов, кодирующих 45S и 5S рРНК.

Гены, кодирующие 5S субъединицу рРНК, локализованы отдельно от 45S рРНК генов, но имеют тот же принцип организации. У злаков локусы 5S рРНК расположены на хромосомах 1 и 5 и содержат до нескольких тысяч единиц, каждая из которых состоит из консервативной кодирующей части длиной 120 пн и варибельного нетранскрибируемого спейсера (Рис. 13) (Appels et al., 1980). В геноме *Triticaceae* присутствуют два подсемейства: *5SDna-1* и *5SDna2* с длиной спейсеров 200-349 и 350-380 пн, соответственно (Gerlach and Dyer, 1980). Различия в размере единиц 5S рДНК обусловлены инсерциями/ делециями в средней полиморфной части спейсера, тогда как 5'- и 3'-фланкирующие районы генов являются консервативными и содержат

сайт связывания РНК-полимеразы III и сайт терминации, соответственно (Appels et al., 1992). У некоторых видов *Brachypodium* были обнаружены очень короткие спейсеры длиной 30 пн, поэтому можно предполагать, что у растений часть спейсерных последовательностей лишена функции (Cox et al., 1992).

Как 45S рРНК, так и 5S рРНК локусы часто подвергаются реорганизации в ходе эволюции. Так, у двух экотипов *A.thaliana* (Landsberg и Columbia) локусы 5S рРНК расположены на разных хромосомах (Murata et al., 1997). У злаков, как размер локусов рРНК, так и их расположение на хромосомах сильно отличаются даже между близкородственными видами (Castilho and Heslop-Harrison, 1995). Следует отметить, что в тех случаях, когда известны генетические карты объектов, изменение локализации локусов рРНК не связано с переносом генов, фланкирующих эти локусы (Dubcovsky and Dvorak, 1995).

1.3. Генетические и эпигенетические изменения у аллополиплоидов

Синтетические аллополиплоиды растений являются уникальной моделью для изучения ранних стадий аллополиплоидизации, поскольку возможность сравнения с имеющимися родительскими формами позволяет отличить геномные реорганизации под действием аллополиплоидии от полиморфизма родительских видов. Молекулярно-генетический анализ показал, что уже на ранних стадиях в геноме аллополиплоида происходят структурные изменения (Kashkush et al., 2002; Gaeta et al., 2007; Madlung et al., 2005), изменения паттерна метилирования ДНК (Madlung et al., 2002; Lukens et al., 2006; Beaulieu et al., 2009), активация мобильных элементов (Parisod et al., 2010; Comai et al., 2000; Kashkush et al., 2003) и изменения транскриптома (Fujimoto et al., 2011; He et al., 2003; Adams et al., 2004; Albertin et al., 2006; Wang et al., 2006; Gaeta et al., 2009; Pumfrey et al., 2009; Rapp et al., 2009).

С использованием синтетических аллополиплоидов были получены доказательства ранних генетических изменений у таких объектов как

пшеница, рапс, хлопок, видов *Arabidopsis* и при этом характер и масштаб изменений, а также время их появления отличались в зависимости от объекта. У синтетических аллотетраплоидов пшеницы между диплоидными видами *Aegilops* и *Triticum*, элиминация последовательностей геномной ДНК происходила в течении короткого времени после формирования аллополиплоидов на стадии F_1 (Shaked et al., 2001). В тоже время, элиминация ДНК не была зафиксирована у синтетических аллогексаплоидов пшеницы, полученных в результате скрещивания *T.turgidum* (ВА) и *Ae.tauschii* (D) (Mestiri et al., 2010). Большинство синтетических аллогексаплоидов пшеницы проявляли гомологичное спаривание хромосом в метафазе I, и лишь отдельные из них демонстрировали нарушения мейоза, приводящие к появлению анеуплоидов, обычно в S_0 поколении. Мейотическая нестабильность зависела от комбинации родителей и была связана с функцией *Ph1* гена, супрессора гомеологичного спаривания (Mestiri et al., 2010). У синтетического рапса *B. napus* генетические изменения в S_0 были довольно редкими (Song et al., 1995; Lukens et al., 2006), однако их частота существенно выросла к поколению S_5 (Gaeta et al., 2007). Фенотипическая вариабельность увеличивалась в последующих поколениях и была связана со значительной реорганизацией хромосом (хромосомные слияния, внутри и межгеномные реорганизации, делеция фрагментов хромосом, анеуплоидия), что предполагает роль хромосомных перестроек в обеспечении фенотипической вариации (Gaeta et al., 2007). В отличие от синтетического рапса, синтетический аллотетраплоид *Arabidopsis suecica* был мейотически стабильным и проявлял низкую частоту анеуплоидии и хромосомных реорганизаций, тем не менее, у него был обнаружен высокий уровень фенотипической вариабельности, по видимому, связанный с эпигенетическими изменениями (сайлесинг генов) (Comai et al., 2000) и реорганизацией отдельных хромосомных локусов (pДНК) (Pontes et al., 2004).

Генетические изменения в ходе аллополиплоидизации укладываются в концепцию «геномного шока», предложенную Б.Мак-Клинтон (McClintock, 1984). Она же высказала идею об участии МЭ в ответе на стрессовые факторы, в частности, отдаленную гибридизацию. Была отмечена активация ряда семейств МЭ у синтетических гибридов и аллополиплоидов (McClintock, 1984; Madlung et al., 2005; Comai et al., 2000).

Транскриптомные изменения у аллополиплоидов могут индуцироваться генетически или эпигенетически (когда экспрессия зависит не от первичной структуры ДНК, а от структуры хроматина) и могут служить источником новых путей дифференцировки и развития аллополиплоидов (Adams et al., 2004; Wang et al., 2006; Rapp et al., 2009).

1.3.1. Хромосомные перестройки

С использованием методов хромосомного окрашивания (GISH, FISH), генетического картирования и молекулярного анализа получены доказательства геномных перестроек как внутри, так и между отдельными субгеномами у аллополиплоидов (Leitch and Bennett, 1997; Wendel, 2000; Lagercrantz and Lydiate, 1996; Gale and Devos, 1998; Chen et al., 2004; Bento et al., 2008). Предполагается, что хромосомные изменения способствуют становлению вновь-образованных аллополиплоидов в качестве полноценных видов (Feldman et al., 1997; Hegarty and Hiscock, 2005; Wendel et al., 1995). Наряду с этим, указанные изменения способствуют адаптации к резко меняющимся условиям внешней среды, поскольку только такие изменения могут обеспечивать «экстремальное» фенотипическое разнообразие (Hegarty and Hiscock, 2005; Crombach and Hogeweg, 2007). Хромосомная реорганизация в процессе аллополиплоидизации может происходить как реакция на ядерно-цитоплазматическое взаимодействие, приводящая к восстановлению фертильности и преодолению несовместимости ядерного и цитоплазматического геномов (Leitch and Bennett, 1997; Brysting et al., 2000).

На моделях синтетических гибридов и полиплоидов было показано, что хромосомные реорганизации возникают сразу после объединения геномов, или в течении нескольких поколений после гибридизации (Rieseberg et al., 1995; Vaack et al., 2005; Song et al., 1995; Feldman et al., 1997; Lukens et al., 2006). Менее охарактеризованы более поздние реорганизации, приводящие к изменению числа хромосом и редукции размера генома (Lysak et al., 2006; Wolfe, 2001; Leitch and Bennett, 2004). Большая часть хромосомных изменений происходит в ходе мейоза и опосредована механизмом гомологичной рекомбинации. Делеции, дупликации и транслокации возникают при восстановлении двуцепочных разрывов (ДЦР) на одной нити ДНК (внутрихромосомная рекомбинация) (Devos et al., 2002; Chantret et al., 2005), по всему геному (эктопическая рекомбинация) (Petrov et al., 2003), либо между гомеологичными хромосомами у гибридов и полиплоидов (гомеологичная рекомбинация) (Udall et al., 2005). Мейотические рекомбинации происходят преимущественно между гомологичными хромосомами (см. обзор Naranjo and Corredor, 2008), при этом они концентрируются в «горячих точках» (hotspots), имеющих специфичное для каждого вида распределение по хромосомам (Anderson et al., 2001; Anderson and Stack, 2002; Jiang et al., 2003). Такие точки были найдены в составе генов у кукурузы (Civardi et al., 1994; Xu et al., 1995) и в межгенных районах у *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2007). Хотя многие растения демонстрируют повышение рекомбинации по направлению к концам хромосом,- вблизи теломерных и субтеломерных районов и отсутствие рекомбинации вблизи центромер (Drouaud et al., 2006), обратная ситуация наблюдается, к примеру, у некоторых видов *Allium* (Khrustaleva et al., 2005).

ДЦР могут инициировать инвазивный переброс нити ДНК на сестринские и несестринские хроматиды в результате остановки репликационной вилки с последующим использованием этих хроматид в качестве матриц для репарационного синтеза ДНК (см. обзор Sung and Klein, 2006). В результате может происходить нереципрочный обмен генетического

материала- генетическая конверсия. ДЦР могут также репарироваться с помощью механизма лигирования негомологичных концов (NHEJ; non-homologous end joining) (Puchta, 1999). Ошибки в ходе этого процесса приводят к инсерциям и делециям в сайте лигирования, а также транслокациям в результате лигирования разных нитей ДНК (Pipiras et al., 1998; Puchta, 2005). Например, у арабидопсиса несвязанные ДЦР могут служить субстратом для реципрокных обменов с помощью как гомологичного, так и негомологичного лигирования концов ДНК (Pacher et al., 2007).

У аллополиплоидов, в отличие от диплоидных растений, происходит изменение сценария мейоза, связанное с добавлением гомеологичных хромосом другого генома (субгенома). Ограничение спаривания только гомологичными хромосомами достигается благодаря генетическому контролю со стороны локусов, контролирующей конъюгацию хромосом (см. главу 1.1.2.3.). Однако, у большинства аллополиплоидов наблюдается смешанный тип мейоза, а именно: некоторые хромосомы образуют биваленты, тогда как другие склонны образовывать мультиваленты-«сегментная аллополиплоидия» (Stebbins, 1971). Мультиваленты, состоящие из гомеологичных и гомологичных хромосом могут давать различные конфигурации в ходе метафазы: перекрещенные структуры, кольца и сцепленные хромосомы. Гомеологичные ассоциации, наряду с паралогичными, приводят к различным перестройкам хромосом, анеуплоидии и усложненным вариантам наследования признаков (см. обзор Gaeta and Pires, 2010). Так, например, геном аллотетраплоида *B. napus* содержит по 6 копий многих генетических локусов, тогда как предковые диплоидные виды имеют по три паралогичных локуса, возникших в результате древних дупликаций. Большинство бивалентов, наблюдаемых у аллогамноидов этого вида в ходе мейоза, образуются между хромосомами-гомеологами, тогда как 30% возникают в результате объединения хромосом внутри одного из субгеномов, по видимому, содержащих дублированные районы (Nicolas et al., 2009). Однако, данные по генетическим изменениям,

возникающим в результате паралогичных ассоциаций хромосом, пока весьма ограничены. В тоже время, имеется много данных, касающихся генетических изменений в результате гомеологичных рекомбинаций (Gaeta and Pires, 2010). Так, в картирующих популяциях *V. napus* и синтетических полиплоидах этого вида RFLP- анализ выявил как делеции, так и дубликации гомеологичных локусов (Parkin et al 1995;; Osborn et al 2003a; Pires et al 2004; Udall et al 2005; Gaeta et al 2007). У недавно сформированных аллополиплоидов *Tragopogon*, изменения генетических маркеров были в ряде случаев связаны с кариотипическими изменениями, обусловленными гомеологичной рекомбинацией (Tate et al., 2006, 2009; Lim et al., 2008). Исследования аллополиплоидов *Nicotiana* и *Arabidopsis* обнаружили, что различные изменения в локусах рибосомальных генов (делеции, амплификации, транслокации) после полиплоидизации могли возникнуть в результате гомеологичной рекомбинации, конверсии и случайной сегрегации, а также в результате разрывов хромосом и NHEJ- механизма (Lim et al., 2000; Pontes et al., 2004; Kovarik et al., 2008). Предполагается, что транспозон- опосредованные разрывы и рекомбинации хромосом играли важную роль в реорганизации рДНК у аллотетраплоида *A. suecica*, что косвенно подтверждается высокой концентрацией транспозонов в районах ядрышковых организаторов (Pontes et al., 2004). Также, наблюдаемая амплификация единиц рДНК у *Nicotiana* возможно произошла в результате неравного кроссинговера (Рис. 14а) (Kovarik et al., 2008). У некоторых синтетических полиплоидов, делеции ДНК наблюдались преимущественно в отцовском геноме (Song et al., 1995; Skalicka et al., 2005). Эти события также могли быть вызваны внутривитрихроматидными обменами (Рис. 14а), однако, причина односторонней элиминации остается неизвестной. У синтетических полиплоидов пшеницы наблюдалась хромосом- и геном- специфичная элиминация низкокопийных кодирующих и некодирующих последовательностей ДНК (Feldman et al., 1997; Ozkan et al., 2001; Shaked et al., 2001; Kashkush et al., 2002). Поскольку у пшеницы гомеологичное

спаривание супрессируется *Ph1* локусом, некоторые делеции могли возникнуть в результате внутрихромосомной рекомбинации. В отличие от пшеницы, у полиплоидного хлопчатника (*Gossypium*) события гомеологичной рекомбинации и связанные с ней перестройки хромосом были весьма редкими (Liu et al., 2001).

В эволюции полиплоидных форм пшениц были отмечены различные хромосомные перестройки, связанные с механизмами гомо- и гомеологической рекомбинации, в частности, крупная транслокация 4A-5A-7B, произошедшая при отделении группы тетраплоидных пшениц Emmer (*T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. durum*), а также пара- и перицентрические инверсии длинного плеча хромосомы 6A (Naranjo et al. 1987; Miftahudin et al. 2004). Геном тетраплоидных пшениц группы Timopheevii характеризуется четырьмя видоспецифичными транслокациями (6AS/1GS, 1GS/4GS, 4GS/4AL, 4AL/3AL) (Jiang, Gill, 1994; Rodriguez et al. 2000). Из трех тетраплоидных видов группы Timopheevii для *T. araraticum* показан высокий уровень внутривидовых хромосомных транслокаций (Badaeva et al. 1994; Badaeva and Gill 1995).

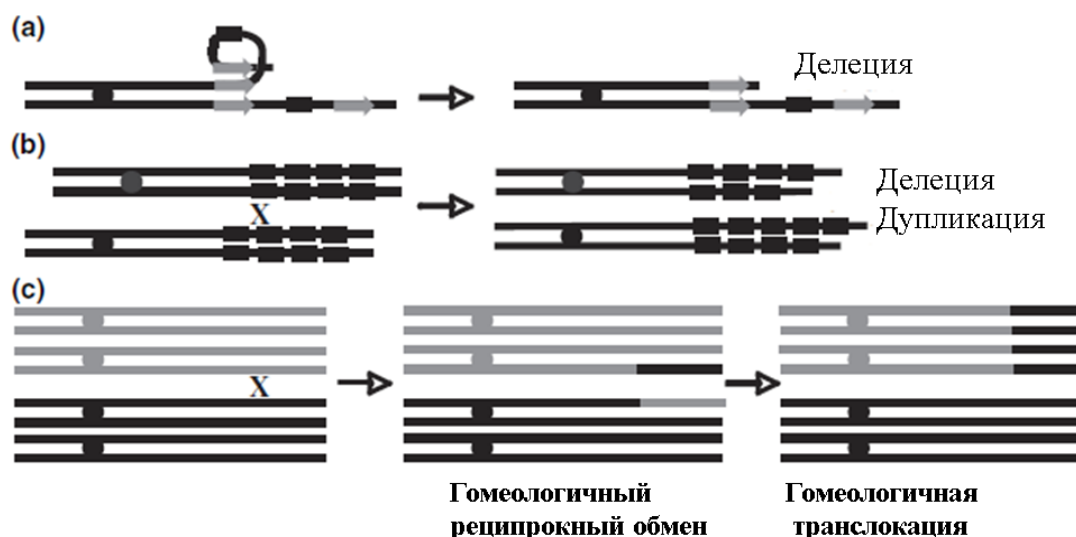


Рис. 14 Рекомбинации и хромосомные перестройки у ди- и полиплоидов (по Gaeta and Pires, 2010). (a) делеция в результате внутрихроматидной рекомбинации между дублированными последовательностями. (b) делеции и дупликации в результате неравного кроссинговера между повторяющимися последовательностями гомологичных хромосом. (c) межгеномные делеции и дупликации в результате гомеологичной рекомбинации у аллополиплоида.

Гомеологичные обмены служат основой для создания интрогрессивных линий, несущих транслоцированные участки хромосом от видов-доноров хозяйственно-ценных признаков. Таким образом были получены линии мягкой пшеницы *T. aestivum*, имеющие признаки устойчивости к биотическим и абиотическим факторам от диких видов Triticeae (McIntoch, 1998; Olson et al., 2010; Budashkina and Kalinina, 2001; Leonova et al., 2011; Леонова и др., 2014).

1.3.2. Структурная дивергенция субгеномов

Рассматривая влияние поведения хромосом в ходе мейоза на фертильность аллополиплоида, можно предполагать, что фертильные аллополиплоиды либо уже обладают определенным уровнем контроля над спариванием хромосом, либо приобретают этот контроль в ходе эволюции. В последнем случае большое значение имеет структурная дивергенция субгеномов, которая обеспечивает преимущественное спаривание гомологичных хромосом (Levy and Feldman, 2002). Свой вклад в структурную дивергенцию гомеологов могут вносить: односторонняя элиминация последовательностей ДНК и реорганизация ПП ДНК (Levy and Feldman, 2002; Ozkan and Feldman, 2009)

Анализ различных межвидовых и межродовых гибридных комбинаций между видами *Aegilops* и *Triticum* показал, что элиминация ДНК происходит уже на ранних стадиях формирования аллополиплоида в F_1 и/или в первом поколении после хромосомного удвоения, при этом данный процесс является стабильно воспроизводимым и может захватывать до 15% геномной ДНК (Ozkan et al., 2001; Shaked et al., 2001). Элиминация затрагивала, главным образом, только один из субгеномов у тетраплоидов и два субгенома у гексаплоидов, и, как следствие, приводила к увеличению физической дивергенции между хромосомами- гомеологами. Так, например, у тетраплоида *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata* элиминации подверглись 14% локусов *Ae. sharonensis*, тогда как второй геном потерял всего 0.5% локусов

(Shaked et al., 2001). Способность элиминировать часть ДНК положительно коррелировала с фертильностью гибридов и отрицательно коррелировала с частотой образования мультивалентов (Levy and Feldman, 2004). Явление односторонней элиминации ДНК было отмечено также у пшенично-ржаных гибридов *Triticum* x *Secale* (Boyko et al., 1988). Наряду с изменением общего содержания ДНК, у аллополиплоидов наблюдались количественные изменения в отдельных фракциях ПП. Так, значительная редукция числа копий повторяющейся субтеломерной последовательности *Spelt1*, занимающей 2% генома *Ae. speltoides*, была обнаружена в первом поколении искусственных амфиплоидов *Triticum-Aegilops*, при этом выявленные изменения не зависели ни от уровня пloidности, ни от направления скрещивания (Salina et al., 2006). Другие авторы с использованием тех же амфиплоидов показали, что примерно 70-90% геном-специфичного tandemного повтора *pGc1R-1a* подверглась элиминации уже в S_2 - S_3 поколениях (Han et al., 2005).

Другим физическим изменением, которое может влиять на структуру хроматина и, как следствие, на спаривание хромосом является изменение степени метилирования ДНК. Влияние метилирования ДНК на экспрессию генов описано в гл. 1.3.4. У амфиплоидов пшеницы эти изменения затронули 13% генетических локусов (Shaked et al., 2001). Интересно, что у синтетических аллотетраплоидов *A. suецica* были случаи, когда метилирование затрагивало только один из двух родительских геномов (Madlung et al., 2002), что указывает на эпигенетическую супрессию одного из субгеномов, аналогичную феномену ядрышкового доминирования (см. гл. 1.3.4.1).

В настоящий момент не ясны движущие силы и механизмы, лежащие в основе всех вышеуказанных изменений геномной ДНК у аллополиплоидов, тем не менее, показано, что они приводят к стабилизации генотипа и повышению фертильности, что является необходимым условием для становления аллополиплоидов в качестве новых видов.

1.3.3. Генетические изменения, связанные с мобильными элементами

Межвидовая гибридизация является стрессовым фактором, который может провоцировать транскрипцию и транспозицию МЭ (Matzke and Matzke, 1998; Comai et al., 2000; Kashkush et al., 2003; Parisod et al., 2010). Накоплению инсерций МЭ могут способствовать следующие процессы в ходе аллополиплоидизации: 1) удвоение генов вызывает снижение давления отбора против вредоносных (негативных) инсерций, что способствует амплификации МЭ (Matzke and Matzke, 1998); 2) эффект «бутылочного горлышка», заключающийся в редукции размера популяции вновь образованного аллополиплоида, благоприятствует случайной фиксации нейтральных или умеренно-негативных инсерций (Lynch, 2007); 3) гибридизация между отдаленными геномами провоцирует «геномный шок», активирующий МЭ и тем самым способствующий инсерционному мутагенезу (McClintock, 1984). В первом случае накопление мутаций происходило бы непрерывно до завершения диплоидизации полиплоидного генома, тогда как в двух других случаях следует ожидать ограниченные по времени взрывы транспозиционной активности, которые быстро затухают по мере расширения популяции полиплоида и стабилизации его генома.

Для анализа генетических изменений, связанных с активацией МЭ, широко используется SSAP (sequence-specific amplified polymorphism)-метод, который позволяет идентифицировать множественные инсерции МЭ по всему геному путем выявления специфических транспозон-ассоциированных фрагментов амплификации в геноме синтетического аллополиплоида по сравнению с родительскими диплоидными геномами (Waugh et al., 1997). В большинстве случаев не было выявлено усиления транспозиционной активности МЭ в первых поколениях полиплоидных растений (Beaulieu et al., 2009; Hazzouri et al., 2008; Parisod et al., 2009; Kashkush et al., 2003). Однако, в нескольких случаях были получены доказательства увеличения транспозиционной активности сразу после аллополиплоидизации (Табл. 2). Процесс активации затрагивал, главным

образом, молодые и активные семейства МЭ, как, например, *Tnt1* элемент табака, имеющие ограниченное число копий в геноме. Таким образом, это явление носит строго избирательный характер и не приводит к общему взрыву транспозиционной активности. По видимому, большую роль в активации мобильных элементов играет специфическое деметилирование ДНК, которое обеспечивает транскрипцию белков, участвующих в процессах вырезания (копирования) и встраивания этих элементов (Fujimoto et al., 2008; Tsukahara et al., 2009).

Наряду с появлением новых SSAP-фрагментов в спектрах аллополиплоидов наблюдалась элиминация фрагментов того или другого родителя. Такая элиминация особенно характерна для транспозонов и связана с их вырезанием, однако, подобные случаи часто наблюдаются и у ретротранспозонов, несмотря на принципиально иной механизм их распространения по геному. Причиной исчезновения фрагментов могут быть реорганизации, затрагивающие сайты инсерции МЭ (Petit et al., 2010). Явление элиминации МЭ происходит более часто, чем транспозиции МЭ и обнаружено у большинства полиплоидов (Табл. 2). Следует отметить односторонний характер структурных изменений, обуславливающих потерю фрагментов того или иного МЭ в геномах аллополиплоидов. Как правило, эти изменения затрагивают либо отцовский, либо материнский геном и интенсивность их может сильно варьировать, в зависимости от МЭ. Так, например, у синтетического аллотетраплоида *Brassica napus*, в сравнении с родительскими диплоидными видами *B. rapa* и *B. oleracea*, перичентромерный ретротранспозон *Athila* характеризуется аддитивным SSAP-профилем, тогда как транспозон *MITE*, распространенный в интерстициальных районах хромосом, имеет до 20% неаддитивных фрагментов, причем их число возрастает в более поздних поколениях аллотетраплоида (Табл. 2). У синтетического *Nicotiana tabacum* структурные изменения МЭ включали, главным образом, элиминацию SSAP-фрагментов отцовского генома (Petit et al., 2010), тогда как у тетраплоида *Spartina anglica*

Табл. 2 Данные по реорганизации МЭ генома после аллополиплоидизации (Parisod et al., 2010).

Модель	МЭ	Активность	Элиминация МЭ	Транскрипционные и эпигенетические изменения	Ссылки
Быстрые изменения					
<i>Arabidopsis thaliana</i> × <i>Arabidopsis arenosa</i>	<i>Surfish</i>	ε	NE	эпигенетические изменения и активация транскрипции	Madlung et al. (2005)
<i>Arabidopsis thaliana</i> × <i>Arabidopsis lyrata</i> (F1/S0, S1, S2)	CAC and Ac-III	-	+ (P)	NE	Beaulieu et al. (2009)
	<i>Wis</i> -like, <i>Cassandra</i> and <i>Ins2</i>	ε	++ (M)	++ метилирование	Parisod et al. (2009)
<i>Spartina alterniflora</i> × <i>Spartina maritima</i> (S0 = <i>Spartina anglica</i>)	<i>Wis</i> -like, <i>Cassandra</i> and <i>Ins2</i>	ε	ε (M)	+ метилирование	Parisod et al. (2009)
	Tnt1	-	-	NE	Petit et al. (2010)
<i>Nicotiana sylvestris</i> × <i>Nicotiana tomentosiformis</i> (F1/S0)	Tnt1	++	+++ (P)	NE	Petit et al. (2010)
	<i>Wis</i> 2-1A	-	NE	активация транскрипции	Kashkush et al. (2003)
<i>Aegilops sharonensis</i> × <i>Triticum monocoecilum</i> (S1)	Retrotansposons and САСТА	-	-	эпигенетические изменения и активация транскрипции	Mestiri et al. (unpublished)
	<i>Athila</i> -like and MITEs	-	+	NE	V. Sarilar & K. Alik (unpublished)
Длигательные изменения					
<i>Nicotiana tabacum</i> (<i>Nicotiana sylvestris</i> × <i>Nicotiana tomentosiformis</i>)	Tnt1, Tnt2 and Tto1	++	+++ (P for Tnt2)	NE	Petit et al. (2007)
	Ретротранспозоны	-	NE	NE	Alix & Heslop-Harrison (2004)
<i>Brassica napus</i> , <i>Brassica satinata</i> , <i>Brassica juncea</i>	САСТА <i>Vol1</i>	-	NE	NE	Alix et al. (2008)
	Различные МЭ	ε	+++ (M)	NE	Zhao et al. (1998); Grover et al. (2007)
<i>Gossypium hirsutum</i> (<i>Gossypium arboreum</i> × <i>Gossypium raimondii</i>)	Различные МЭ	+	++ (P)	NE	Lu et al. (2009)
	Различные МЭ	+++	+++	NE	Chartet et al. (2005); Charles et al. (2008)
<i>Oryza minuta</i> (<i>Oryza punctata</i> × <i>Oryza officinalis</i>)					
<i>Triticum aestivum</i> (<i>Triticum turgidum</i> × <i>Aegilops tauschii</i>)					

- нет док-в ε, ≤ 5%; +, 5–10%; ++, 10–40%; +++, > 40%; NE, не оценивалось
P, опловское; M, материнское; - применительно к происхождению МЭ, подвергшихся элиминации

наблюдалась преимущественная элиминация фрагментов материнского происхождения (Parisod et al., 2009).

Аллополиплоидизация индуцирует быстрые изменения транскрипции МЭ, которые сопровождаются эпигенетическими изменениями (Comai et al., 2003; Josefsson et al., 2006; Michalak, 2009). Усиление транскрипции МЭ было обнаружено у синтетических аллополиплоидов пшеницы (Kashkush et al., 2002) и у арабидопсиса (Madlung et al., 2005), что, однако, не приводило к увеличению частоты транспозиций. Тем не менее, эпигенетические изменения, связанные с усилением транскрипции МЭ могут оказывать влияние на экспрессию соседних генов, приводя к фенотипической изменчивости (Kashkush et al., 2003; Slotkin and Martienssen, 2007).

В более длительном масштабе эволюция МЭ в составе аллополиплоидов сохраняет все вышеперечисленные тенденции, а именно: ограничение транспозиций, главным образом, молодыми семействами МЭ с небольшим числом копий, преобладание структурных изменений МЭ, не связанных с их перемещениями (делеции), преимущественно односторонний характер этих изменений в составе отцовского или материнского геномов, влияние эпигенетических изменений МЭ на экспрессию соседних генов (Parisod et al., 2010). Однако, не столь заметные на коротком отрезке времени, эти процессы спустя длительное время могут приводить к значительной реорганизации генома. Так, у аллополиплоидов рода *Nicotiana*, образовавшихся около 1 млн лет назад, произошел существенный обмен мобильными элементами между субгеномами (Lim et al., 2007). Это и другие исследования (Zhao et al., 1998; Charles et al., 2008) показали, что дифференциальная пролиферация и элиминация различных повторяющихся последовательностей ДНК играет важную роль в структурной реорганизации субгеномов у аллополиплоидов. Однако, существуют и другие примеры. У видов рода *Brassica* был описан С-геном-специфичный *САСТА*-транспозон *Bot1*, который сыграл основную роль в дивергенции геномов на диплоидном

уровне. Анализ естественного аллополиплоида *V. parvus* (ААСС) не выявил распространения этого элемента на хромосомы А-генома (Alix et al., 2008).

МЭ могут участвовать в хромосомных реорганизациях под влиянием аллополиплоидизации. Одним из основных направлений эволюции полиплоидного генома является уменьшение его размера, связанное с диплоидизацией. Хотя механизмы редукции генома пока не ясны, предполагается участие в этих механизмах МЭ. Например, в субгеномах *T.aestivum* происходили обширные делеции в результате неравного или незаконного кроссинговера между последовательностями МЭ (Chantret et al., 2005; Bento et al., 2008). Был предложен механизм рекомбинации между длинными терминальными повторами ретротранспозонов, приводящий к делеции протяженных фрагментов геномной ДНК между этими повторами (Vitte and Panaud, 2005). Модель незаконной рекомбинации с участием последовательностей МЭ рассматривается для объяснения факта делеции *Hardness* локуса, контролирующего плотность эндосперма у пшеницы, в различных субгеномах полиплоидных пшениц (Chantret et al., 2005).

И, наконец, принимая во внимание высокую мутагенность МЭ, можно рассматривать их роль в качестве модификаторов генов-гомеологов, направляющих их структурную дивергенцию в сторону суб- или неофункционализации (Walsh, 2003). Косвенным свидетельством этой роли служат следы инсерций МЭ в регуляторных и кодирующих районах у большинства известных генов растений. Были предложены различные механизмы усиления структурно-функциональной дивергенции генов с помощью МЭ (Bennetzen, 2005), однако, остается неясной степень реализации этих механизмов у тех или иных аллополиплоидов.

Таким образом, полученные данные указывают на локальные генетические (элиминация) и эпигенетические изменения во фракции МЭ в ходе аллополиплоидизации, в сочетании с усилением транспозиционной активности ограниченного числа семейств МЭ. Такое поведение МЭ наиболее согласуется с концепцией геномного шока и связано с

преодолением геномной несовместимости и структурно-функциональной дивергенцией гомеологичных геномов (диплоидизация) (McClintock, 1984; Comai et al., 2003). Быстрые изменения МЭ на ранних стадиях аллополиплоидизации предполагают их важную роль в качестве индукторов нестабильности, приводящей к глобальной реорганизации как хромосом, так и отдельных последовательностей полиплоидного генома. Индукция нестабильности может иметь негативные последствия для генома, поэтому в процессе эволюции происходит постепенное восстановление контролирующего влияния генома на пролиферацию МЭ, что выражается в их количественных, структурных и эпигенетических изменениях. Большую роль в восстановлении стабильности аллополиплоидного генома играет малая РНК (см. главу 1.3.4.2.).

1.3.4. Эпигенетические изменения

К эпигенетическим изменениям, как известно, относят такие генетические изменения, которые могут стабильно поддерживаться на протяжении многих делений соматических клеток, но при этом не связаны с изменением первичной структуры ДНК (Ng and Gurdon, 2008; Probst et al., 2009). В основе эпигенеза лежат 2 основных типа механизмов: транскрипционные и посттранскрипционные. К первому типу относятся механизмы: а) модифицирующие ДНК и б) модифицирующие гистоновые белки. Основным механизмом модификации ДНК является метилирование остатков цитозина (Bird, 2002). У растений метилирование цитозина происходит как симметрично по обеим цепям (на CpG или CpNpG), так и асимметрично лишь на одной из двух цепей (на CpNpNp, где N обозначает любой нуклеотид) (Vanyushin, 2006). Известно, что метилирование цитозина в промоторных областях генов приводит к подавлению их транскрипционной активности, тогда как деметилирование этих областей приводит к усилению транскрипции (Bird, 2002). Модификации гистоновых белков лежат в основе конформационных изменений хроматина, которые, в

свою очередь, обеспечивают доступность молекулы ДНК для ферментов синтеза РНК (Kouzarides, 2007). Наиболее частыми модификациями гистонов являются ацетилирование и метилирование аминокислот, при этом выявлены высоко-консервативные модификации гистонов по определенным аминокислотам, характерные для активного (неактивного) состояния целого ряда генов из различных организмов (Martin and Zhang, 2005; Kouzarides, 2007). Следует отметить, что работу всех вышеперечисленных механизмов обеспечивают не только специфические белки- ферменты (ДНК метил-трансферазы, гистонметилтрансферазы, ацетил-трансферазы и тд), но и различные низкомолекулярные некодирующие РНК, относящиеся либо к малым интерферирующим РНК (siRNA), либо к микро-РНК (miRNA) (Zaratiegui et al., 2007; Yang and Kuroda, 2007; Mattick et al., 2009; Ghildiyal and Zamore, 2009). Эти РНК отвечают за сборку специфических белковых комплексов и их «заякоривание» на участках ДНК, подвергающихся тем или иным модификациям. Что касается посттранскрипционных эпигенетических механизмов, то они включают механизмы интерференции мРНК с помощью малой некодирующей РНК, что приводит либо к деградации мРНК, либо к ингибированию ее трансляции (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009; Hoffer et al., 2011).

Формирование аллополиплоидов, в целом, сопровождается изменениями в экспрессии генов, которые могут быть связаны как с генетическими событиями (инсерциями МЭ, к примеру), так и с эпигенетическими модификациями. Так, у синтетической аллогексаплоидной пшеницы изменения экспрессии генов-гомеологов были установлены уже на ранних стадиях развития и были сходными с таковыми у природной формы мягкой пшеницы *T. aestivum* (Chague et al., 2010). Раскрытие механизмов ранних генетических (эпигенетических) изменений необходимо для понимания эволюционных процессов, приводящих к становлению современных аллополиплоидных видов.

1.3.4.1. Ядрышковое доминирование

Одним из наиболее известных эпигенетических феноменов, наблюдаемым у аллополиплоидов, является «ядрышковое доминирование» (nucleolar dominance), или эпигенетическое подавление экспрессии рРНК генов одного из родительских геномов. Это явление наблюдается у многих организмов: растений, земноводных, насекомых, млекопитающих (Navashin, 1934; Reeder, 1985; Neves et al., 2005; Preuss and Pikaard., 2007). Ядрышковое доминирование в основном изучено на примере межвидовых гибридов и возникает независимо от направления скрещивания (материнского и отцовского эффектов), что указывает на отсутствие роли гаметного импринтинга. Направление доминирования не является случайным в каждой конкретной комбинации геномов, в тоже время эффект доминирования не является постоянным для рРНК генов того или иного генома.

Механизмы ядрышкового доминирования еще полностью не изучены, однако, уже очевидно, что они связаны с развитием и дифференцировкой клеток. У гибридов внутри родов *Crepis* и *Triticum*, ядрышковые организаторы (NORs), которые были супрессированы в вегетативных тканях, становились активными в мужских мейоцитах (Wallace and Langridge, 1971; Silva et al., 1995). У аллотетраплоидных гибридов *Brassica*, супрессированные в вегетативных органах и нецветковых меристемах NORs активировались в органах цветка, включая чашелистики и лепестки (Chen and Pikaard, 1997). Последние органы не дают начало половым клеткам, следовательно, мейоз не является необходимым для активации ядрышек. В целом, поддержание ядрышкового доминирования зависит от стадии развития, так что NORs, которые неактивны в вегетативных органах, становятся активными при переходе к цветению и/или гаметогенезу.

Эпигенетические изменения (ДНК метилирование и модификации гистонов) лежат в основе замолкания рРНК генов под действием ядрышкового доминирования. Участие этих механизмов у гибридов *Arabidopsis*, *Brassica* и *Triticale* подтверждается фактом дерепрессии рРНК

генов с помощью обработки ингибитором ДНК метилтрансферазы- 5-azaC (5 азацитидин), или ингибитором гистондеацетилазы- TSA (трихостатин А) (Neves et al., 1995; Chen and Pikaard, 1997; Chen et al., 1998; Lawrence et al., 2004; Castilho et al., 1995). Совместная обработка 5-azaC и TSA не дает дополнительного эффекта, что указывает на то, что ДНК метилирование и деацетилирование гистонов являются механизмами, действующими на один и тот же путь регуляции (Chen and Pikaard, 1997).

Подходы обратной генетики позволили идентифицировать факторы модификации хроматина, необходимые для ядрышкового доминирования. У аллотетраплоида *A. suecica*, NORs, унаследованные от *A. thaliana* находятся в состоянии репрессии, тогда как NORs субгенома *A. arenosa* активно экспрессируются (Fujimoto et al., 2011; Beaulieu et al., 2009; Chen et al., 1998; Lewis et al., 2007). Репрессия генов рРНК *A. thaliana* происходит в постэмбриогенный период, коррелируя с переходом ядрышек из деконденсированного состояния в состояние гетерохроматина (Pontes et al., 2007). С использованием трансгенно-индуцируемых интерферирующих РНК (iRNA) было установлено, что гистон-деацетилазы HD1 и HDA6 участвуют в подавлении экспрессии рРНК. Нокаун, или искусственное понижение экспрессии генов *HD1* и *HDA6* было достаточным условием для реактивации рРНК генов *A. thaliana* в зрелых листьях растений *A. suecica* (Lawrence et al., 2004; Earley et al., 2006). Продукты HD1 and HDA6 локализуются в ядрышках, где происходит транскрипция рРНК генов, что предполагает прямое действие этих продуктов на указанные гены. Функция гистондеацетилазы заключается в деацетилировании ряда лизиновых аминокислот гистонов H3 и H4 (Earley et al., 2006) и ее активность блокируется TSA (см. выше), что приводит к активации генов рРНК. Другим маркером репрессированного состояния генов рРНК, помимо деацетилированных остатков лизина, является диметилированный лизин в положении 9 гистона H3 (H3K9me2) (Lawrence et al., 2004). Активные рРНК гены *A. arenosa* содержат маркеры активации, в частности,

триметилированный лизин в четвертом положении H3-гистона (H3K4me3) (Lawrence et al., 2004; Earley et al., 2006).

Помимо модификаций гистонов важным фактором эпигенетического замолкания генов рРНК является метилирование остатков цитозина в молекуле ДНК (Chen and Pikaard, 1997; Preuss et al., 2008). Следует отметить тесную взаимосвязь между метилированием ДНК в промоторных районах рРНК генов и модификацией гистонов: ингибирование метилирования цитозина приводит к снижению маркеров репрессии в гистоновых белках, а ингибирование репрессирующих модификаций гистонов приводит к уменьшению метилирования цитозина (Earley et al., 2006; Lawrence et al., 2004). В целом, эти наблюдения подтверждают тесное сопряжение процессов метилирования ДНК и модификации гистоновых белков в механизме транскрипционного сайлесинга генов (Lawrence et al., 2004). Недавно было установлено участие в метилировании генов рРНК следующих белков: *de novo* ДНК метилтрансферазы DRM2, компонентов РНК-опосредованного метилирования ДНК: RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase 2) и DCL3 (Dicer-like 3), а также метилцитозин-связывающих белков MBD6 (Methyl-CpG-binding domain 6) и MBD10 (Preuss et al., 2008). Процесс метилирования ДНК, осуществляемый DRM2, направляется малой интерферирующей РНК (siRNA), синтез которой требует активности RDR2 и DCL3. Соответственно нокдаун двух последних продуктов приводит к отмене ядрышкового доминирования. Эти данные указывают на то, что, помимо супрессии транспозонов и некодирующих повторов (см.далее), siRNA участвует в механизме сайлесинга генов рРНК (Preuss et al., 2008). Белок MBD10 локализуется в пределах всего ядра, тогда как MBD6 преимущественно связан с молчащими рРНК генами и эта ассоциация зависит от присутствия DRM2. Предполагается, что MBD6 и MBD10, присоединяясь к метилированным остаткам цитозина, служат маркерами для модификации хроматина (гистонов), которая приводит к подавлению

транскрипции и формированию конденсированного состояния ядрышек (Рис. 15) (Preuss et al., 2008).

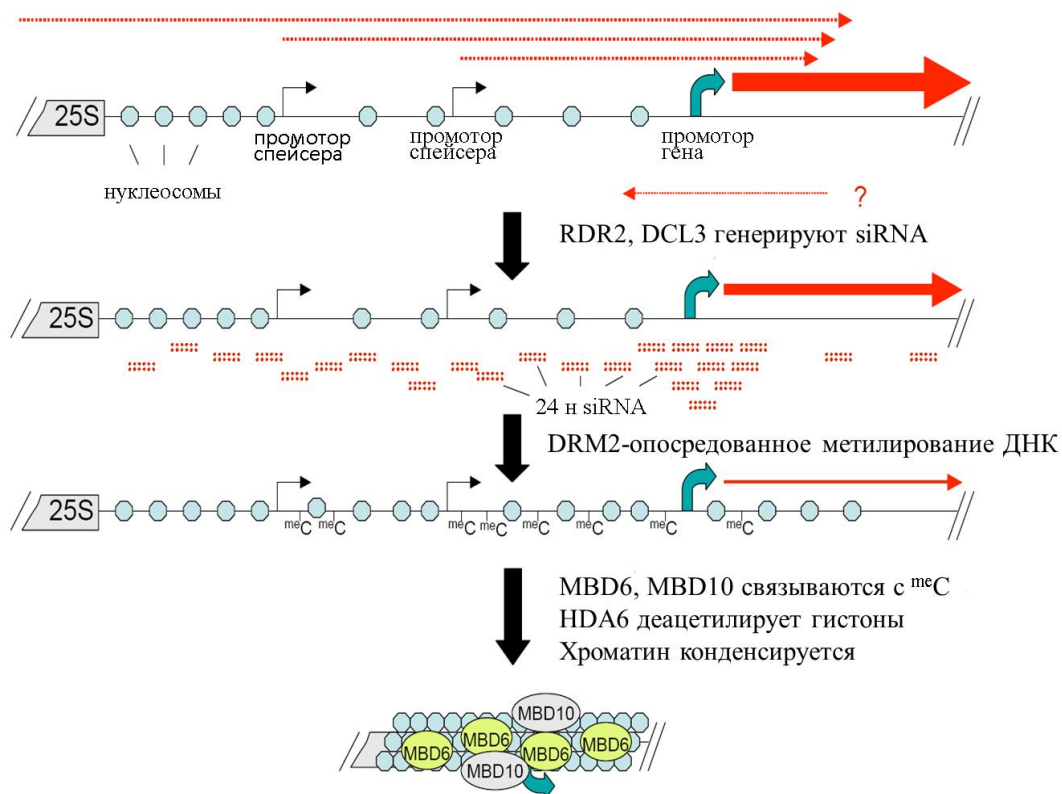


Рис 15. Модель РНК-направленного метилирования генов рРНК. Транскрипция внутри некодирующего спейсера (красные пунктирные стрелки) инициирует продукцию siRNA с помощью RDR2 и DCL3. Предполагаемая двунаправленная транскрипция вблизи промотора гена может генерировать локальное скопление siRNA (hotspot). siRNA направляет *de novo* метилирование спейсерной последовательности с помощью DRM2. Присоединение MBD6 и MBD10 к метилированной ДНК в сочетании с деацетилированием гистонов приводит к подавлению транскрипции и последующей компактизации хроматина (Preuss et al., 2008).

1.3.4.2. Роль малой РНК

Малая РНК играет важную роль в эпигенетических изменениях в ходе аллополиплоидизации, поскольку изменения в уровне экспрессии (накопления) этой РНК неоднократно наблюдались у межвидовых гибридов (Ha et al., 2009; Kenan-Eichler et al., 2011). Выделяют различные классы малой РНК, различающиеся по структуре, при этом основными являются малая интерферирующая РНК (siRNA) и микро-РНК (miRNA) (Zaratiegui et al., 2007; Yang and Kuroda, 2007; Mattick et al., 2009; Carthew and Sontheimer,

2009; Ghildiyal and Zamore, 2009). Часть siRNA связана с репрессией генов у диплоидных организмов, например, генов рРНК (см. выше), другая значительная часть siRNA участвует в сайлесинге транспозонов и повторяющихся последовательностей ДНК гетерохроматина (Lippman and Martienssen, 2004). Механизм действия различных siRNA связан с эпигенетическим изменением структуры хроматина, поскольку было показано их участие в модификации гистонов и метилировании ДНК (Preuss et al., 2008; Baulcombe, 2004; Lippman and Martienssen, 2004). В частности, у аллотетраплоида *A. suecica* происходит накопление siRNA в центромерных районах хромосом генома *A. thaliana*, что коррелирует с гиперметилированием ДНК этих районов (Chen et al., 2008). У данного аллотетраплоида изменения экспрессии siRNA не коррелируют с экспрессией неаддитивных генов (проявляющих неаддитивный характер экспрессии), что указывает на то, что siRNA в основном массе не участвует в регуляции этих генов (Ha et al., 2009).

Была предложена модель дозо-зависимого, контролирующего влияния siRNA на пролиферацию МЭ в ходе аллополиплоидизации (Josefsson et al., 2006). В результате гибридизации, количество материнской siRNA в F₁ зиготе недостаточно для полного контроля инсерций МЭ, как материнского, так и отцовского происхождения. Редукция siRNA в F₁ приводит к активации мобильных элементов и, как следствие, индукции генетической нестабильности, которая может обуславливать низкую фертильность аллополиплоида (Comai et al., 2000; Wang et al., 2004). Со временем стабильность генома восстанавливается, благодаря согласованию структурно-эпигенетических изменений во фракции МЭ (см. главу 1.3.3.) и экспрессии siRNA (Рис. 16) (Ha et al., 2009).

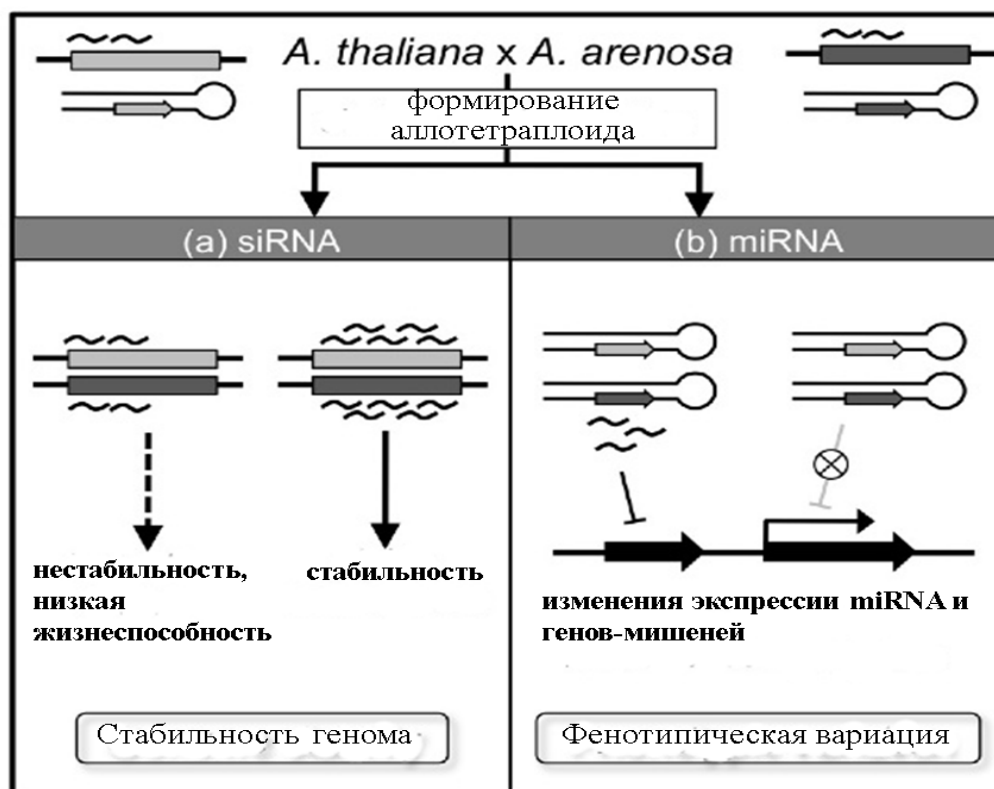


Рис. 16 Роль малой РНК в формировании аллотетраплоида *A.thaliana* x *A. arenosa* (Ha et al., 2009).

В отличие от siRNA, микро РНК (miRNA) и транс-действующая РНК (tasiRNA; trans-acting siRNA) опосредуют вариабельность экспрессии неаддитивных генов между близкородственными видами и в составе аллополиплоидов (Ha et al., 2009). Механизм влияния miRNA на экспрессию генов-мишеней- интерференция с мРНК, вызывающая деградацию последней (Brown et al., 2007). Локусы предшественников miRNA могут дивергировать, как следствие генетических и эпигенетических изменений, порождая новые паттерны экспрессии (Chen, 2007). Комбинация этих локусов у межвидовых гибридов и новых аллополиплоидов приводит к цис- и транс- действующим эффектам на экспрессию miRNA. Как результат, уровень накопления miRNA приобретает неаддитивный характер (Chen, 2007), что обуславливает неаддитивную экспрессию генов-мишеней у гибридов (Wang et al., 2006). Кроме того, возможны межгеномные различия, определяющие различную эффективность miRNA-опосредованной супрессии гомеологичных генов. Так, например, у аллотетраплоида

A. suecica был выявлено преимущество некоторых генов *A. thaliana*, по сравнению с соответствующими генами *A. arenosa*, для miRNA-зависимого механизма супрессии (Wang et al., 2006). Это преимущество возможно обусловлено дивергенцией нуклеотидных последовательностей гомеологичных генов и их вторичных структур, влияющих на эффективность супрессии мРНК с помощью miRNA (Long et al., 2007). В согласии с высокой предрасположенностью генов *A. thaliana* к изменениям экспрессии у аллотетраплоидов (Ni et al., 2009; Wang et al., 2006), находится тенденция miRNA-зависимой деградации продуктов генов *A. thaliana* (Ha et al., 2009).

У растений и животных многие гены-мишени miRNA кодируют транскрипционные факторы, или белки, имеющие значение для роста и развития. Например, у растений *Arabidopsis* miR164 связан с апоптозом, или программируемой клеточной гибелью (Kim et al., 2009); tasiRNA влияет на латеральный органогенез и переход от ювенильной к взрослой стадии развития (Peragine et al., 2004); miR168 и miR403 обеспечивают обратную связь в регуляции биогенеза miRNA (Rajagopalan et al., 2006). Неаддитивная регуляция этих miRNA и их мишеней у аллополиплоидов может приводить к появлению новых фенотипических форм.

Таким образом, суммируя данные изучения малой РНК, можно сделать вывод, что аллополиплоиды использовали ее как важный фактор защиты от генетического конфликта в ходе межвидовой гибридизации. Этот механизм защиты включает siRNA-зависимое поддержание стабильности генома и miRNA-опосредованную вариацию экспрессии генов, обуславливающую фенотипическое разнообразие аллополиплоидных видов (Рис. 16).

1.3.5. Изменения экспрессии и структурно-функциональная дивергенция гомеологичных генов

Сравнительный анализ экспрессии генов у синтетических аллополиплоидов и соответствующих родительских линий обнаружил, что

на фоне аддитивной экспрессии большинства генов существуют различные варианты неаддитивной экспрессии (когда суммарная экспрессия гомеологичных генов у гибрида неравна среднему значению их экспрессии у родителей) (Qi et al., 2012). Частным случаем последней является доминирование экспрессии генов одного из родителей (односторонняя экспрессия). Односторонний тип экспрессии гомеологичных генов был отмечен у синтетического аллогексаплоида пшеницы (Kashkush et al., 2002; He et al., 2003; Pumphrey et al., 2009; Akhunova et al., 2010; Qi et al., 2012), а также у аллотетраплоида хлопчатника *G.hirsutum* (AD-геном) (Rapp et al., 2009; Chaudhary et al., 2009; Novav et al., 2008; Flagel et al., 2010; Flagel and Wendel, 2010). В последнем случае 30% гомеологичных генов проявляли односторонний паттерн экспрессии (A- или D-геном специфичный) на разных стадиях развития индивидуальных клеток ткани волокна. Что характерно, большая часть этих генов проявляла D-геном специфичный паттерн экспрессии,- особенность также характерная для природного аллотетраплоида (Novav et al., 2008; Flagel et al., 2010; Flagel and Wendel, 2010). Явление односторонней экспрессии гомеологов было также показано у таких растений как арабидопсис, сахарный тростник, аллотетраплоид *Cucumis x hytivus* (Comai et al., 2000; Mudge et al., 2009; Zhuang and Chen, 2009). На таких объектах как хлопчатник, *Nicotiana* и *Tragopogon* было продемонстрировано, что сдвиг экспрессии в сторону одного из родителей является тканеспецифичным, те зависит от органа, стадии развития, а также от воздействия биотического/ абиотического стресса (Adams et al., 2003; Adams et al., 2004; Chaudhary et al., 2009; Buggs et al., 2010; Dong and Adams, 2011). Следует отметить, что во всех выше-указанных работах анализировались транскриптомные изменения.

Изменения транскрипции генов-гомеологов, как ожидается, влияет на экспрессию белков и, в конечном счете, фенотип. Исследование синтетического аллотетраплоида *B. napus* обнаружило, что 2/3 гомеологичных генов с аддитивным характером экспрессии мРНК проявляют неаддитивную

экспрессию белков, что указывает на то, что изменения транскрипции далеко не всегда объясняют дифференциальную регуляцию белковых продуктов (протеомные изменения) (Marmagne et al., 2010). Другое исследование этого же объекта проследило протеомные изменения на протяжении четырех поколений (F_1 - F_4) после скрещивания и обнаружило их стохастичность, те случайное чередование эпизодов сайлесинга и реактивации при переходе от одного поколения к другому (Kong et al., 2011). Предполагается потенциальная роль механизмов экспрессии/накопления малой РНК (miRNA), в процессе стохастической трансляционной регуляции белков у аллополиплоидов (см. гл. 1.3.4.2).

Было показано, что в основе изменений экспрессии генов у аллополиплоидов лежат эпигенетические изменения, в особенности, изменения уровня метилирования ДНК (Shaked et al., 2001; Madlung et al., 2002). Так, обработка растений 5-azaC приводила к появлению большего количества фенотипических отклонений у синтетического аллотетраплоида *Arabidopsis suecica*, по сравнению с диплоидными родительскими видами (Madlung et al., 2002). Это указывает на важное значение эпигенетических механизмов сайлесинга в поддержании баланса генов и их продуктов в ходе развития полиплоидного растения. Однако, не всегда эпигенетические изменения обуславливают изменения экспрессии генов. У хлопчатника не выявлены изменения паттернов метилирования ДНК, которые бы объясняли особенности экспрессии гомеологичных генов в составе природных и синтетических аллополиплоидов этого вида (Liu et al., 2001). Это указывает на отсутствие универсального механизма, контролирующего экспрессию генов у аллополиплоидов; по видимому, для каждого вида характерно специфическое сочетание генетического и эпигенетического регуляторных механизмов.

С функциональной точки зрения несколько механизмов определяют судьбу гомеологичных генов с момента возникновения аллополиплоида. Первый путь - субфункционализация, или разделение первоначальной

функции между дублированными генами, так что обе копии функционально комплементируют (дополняют) друг друга (Force et al., 1999; Lynch and Force, 2000). Как показали многочисленные исследования, данный феномен характерен для ранних стадий формирования аллополиплоидов и приводит к сохранению значительного числа генов в дублированном состоянии (Рис. 17) (Adams et al., 2003; Flagel et al., 2008; Chaudhary et al., 2009). Процесс субфункционализации преобладает над процессом элиминации гомеологичных генов, который является довольно редким (Grover et al., 2004, 2007).

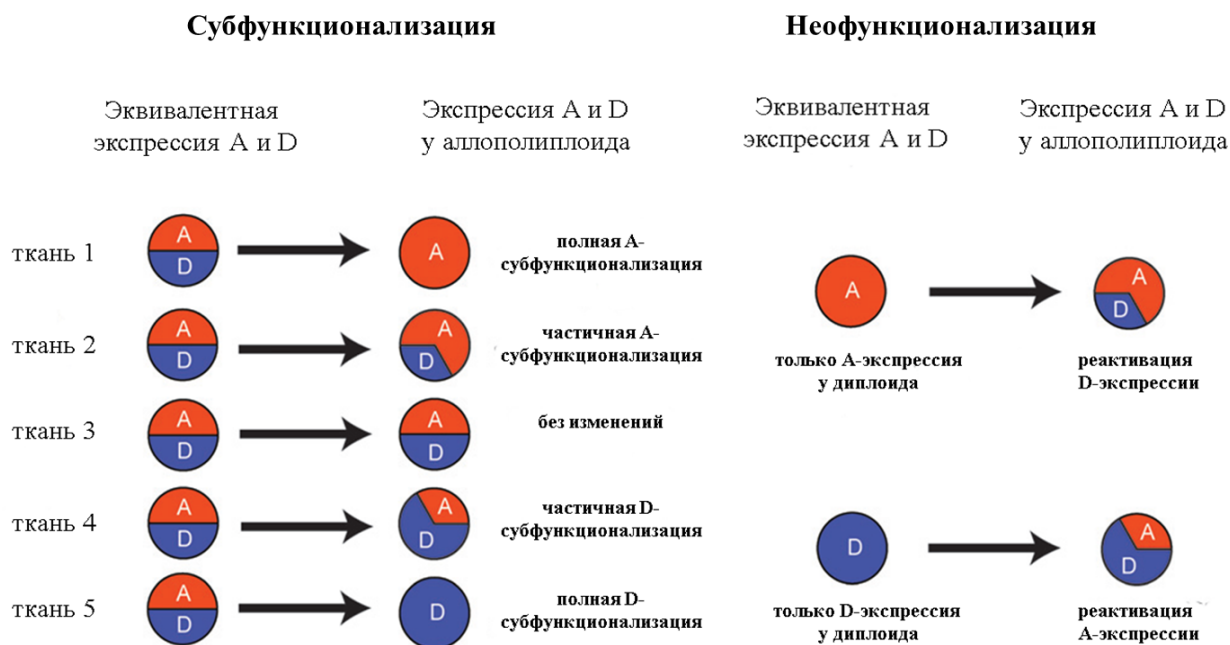


Рис. 17 Механизмы структурно-функциональной дивергенции дублированных генов (Chaudhary et al., 2009). После объединения геномов регуляторные изменения индуцируют дивергенцию паттернов экспрессии аллельных/гомеологичных генов. Это приводит к субфункционализации (к разделению функции гена между отдельными копиями), или к неофункционализации (появлению новых паттернов экспрессии относительно родительских видов).

В ходе дальнейшей эволюции аллополиплоида дублированные гены, которые не подвергались субфункционализации могут еще сохраниться, благодаря приобретению одной из копий новой функции (неофункционализации) (Force et al., 1999; Lynch et al., 2001). Наиболее

ранние проявления неофункционализации в ходе формирования аллополиплоидного растения были впервые обнаружены у синтетического хлопчатника (Chaudhary et al., 2009). В этой работе у 15 генов из 8 различных тканей было зафиксировано появление принципиально новых паттернов экспрессии в поколении F_1 (Рис 17). В эволюционной перспективе процесс неофункционализации, также как в случае субфункционализации, приводит к сохранению обеих копий генов, но при этом накопление мутаций приводит к их постепенной дивергенции друг относительно друга. Исходя из этого, следует предполагать, что наиболее ранними являются события субфункционализации генов и с возрастом аллополиплоида возрастает вероятность их неофункционализации (Rastogi and Liberles, 2005). Частным случаем неофункционализации является уход от адаптивного конфликта (EAC; escape from adaptive conflict), хотя некоторые авторы рассматривают этот механизм как отдельный (Hittinger and Carroll, 2007; Des Marais and Rausher, 2009).

И, наконец, третий механизм эволюции гомеологичных генов- псевдофункционализация (когда один из генов теряет свою функцию, превращаясь в псевдоген) (Adams and Wendel, 2005; Chaudhary et al., 2009).

Уровень и скорость структурно-функциональной дивергенции генов-гомеологов после полиплоидизации значительно варьирует в зависимости от вида. Так, у гибрида *A.thaliana* x *A.arenosa* 0.4% генов показали изменения паттернов экспрессии сразу после полиплоидизации, тогда как за время дивергенции родительских видов (1.5 млн лет) эти изменения произошли у 2.5% генов (Comai et al., 2000). У вновь-синтезированных гексаплоидной пшеницы и тетраплоидного хлопчатника 5% генов были супрессированы в течение нескольких поколений после полиплоидизации (Kashkush et al., 2002; He et al., 2003; Adams et al., 2004). Пример быстрой эволюции- недавно сформированный аллополиплоидный вид *Tragopogon*, у которого ряд генов подвергся субфункционализации в течение 80 лет или 40 поколений (Buggs et al., 2010). У природного аллотетраплоида хлопчатника, возникшего 1-2 млн

лет назад, изменения паттернов экспрессии произошли у 25% гомеологичных генов (Adams et al 2003). Аналогичные изменения произошли в ходе эволюции у половины гомеологичных генов аллогексаплоидной пшеницы (Pont et al., 2011). Рис, *Oryza sativa*, как пример палеополиплоида, показал изменения экспрессии 88-96% генов в течении 50-70 млн лет (Throude et al., 2009). Эти данные указывают на то, что аллополиплоидизация индуцирует быстрые изменения экспрессии (транскриптомный шок) у большого числа генов, что приводит к ремоделированию генных сетей и способов их регуляции (Flagel and Wendel, 2010). Эти изменения создают основу для структурно-функциональной дивергенции генов, обеспечивающей широкую адаптацию полиплоидных растений.

Работы, направленные на изучение полного транскриптома аллополиплоидов позволяют оценить изменения картины экспрессии генов в целом, однако, не дают представления об изменениях в составе конкретных генов и о связи этих изменений с фенотипическими или биохимическими признаками. Поэтому анализ индивидуальных генетических локусов остается одним из основных направлений исследований в данной области (Morimoto et al., 2005; Nomura et al., 2005; Appleford et al., 2006; Shitsukawa et al., 2007). Особый интерес представляют гены, вносящие вклад в расширение адаптивного потенциала аллополиплоидов, гены развития и гены-мишени для искусственного отбора. К таковым относятся гены, регулирующие продолжительность вегетационного периода и время цветения.

1.4. Генетический контроль продолжительности вегетационного периода у диплоидных и полиплоидных видов высших растений

Активное изучение генетических механизмов перехода к стадии цветения на модельных видах растений позволило выявить сложную сеть генов, контролирующих этот переход в зависимости от внешних факторов,

таких как температура и длина светового дня. У основного модельного объекта растений- *Arabidopsis thaliana* были идентифицированы и функционально охарактеризованы ключевые гены, определяющие продолжительность вегетационного периода (He and Amasino, 2005; Michaels, 2009). Эти ключевые гены, или гены- интеграторы объединяют различные регуляторные каскады, принимающие сигналы от внешних и внутренних факторов (системы генов яровизации, чувствительности к фотопериоду, реакции на гиббереллин и др.). При определенном сочетании различных факторов гены- интеграторы непосредственно активируют гены, индуцирующие формирование цветковых меристем. У аллополиплоидных растений эта схема регуляции значительно усложняется, благодаря присутствию гомеологичных копий каждого из генов. Ниже проведено сопоставление соответствующих механизмов у диплоидного вида *A. thaliana* и у злаков, включая аллогексаплоидный вид *T. aestivum*.

1.4.1. Генетический контроль времени цветения у *A. thaliana*

Успешное размножение растения требует сопряжения момента оплодотворения и развития семян с благоприятными климатическими условиями. В условиях умеренного климата для обеспечения процесса цветения весной или летом возникла генетическая система, воспринимающая сигнал низкой температуры в зимний период и транслирующая этот сигнал в повышенную предрасположенность к цветению,- процесс известный как яровизация. Исследования, проведенные на арабидопсисе показали эпигенетическую природу данного феномена и выявили молекулярный механизм того, как компетентность к цветению, сформированная под действием яровизации позволяет растению реагировать на второй важный стимул перехода к генеративной фазе- длину светового дня. Одним из ключевых генов у арабидопсиса, определяющим ответ на яровизацию является ген *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), который кодирует MADS-домен- содержащий транскрипционный фактор, действующий в качестве репрессора цветения

(Schmitz and Amasino, 2007). Экспрессия *FLC* находится под тесным контролем ряда активаторов и супрессоров (Рис. 18). Основным активатором является ген *FRI* (*FRIGIDA*), мутации в котором отвечает за большую часть вариации времени цветения среди природных популяций арабидопсиса (LeCorre et al., 2002; Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005). Эффект активации *FLC* под действием *FRI* доминирует над супрессирующим эффектом генов-регуляторов автономного пути, однако, может быть преодолен обратным эффектом яровизации (Schmitz and Amasino, 2007). Ответ на яровизацию начинается с индукции гена *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) и приводит к необратимой, митотически-стабильной репрессии *FLC*, с помощью эпигенетического механизма (Рис. 18).

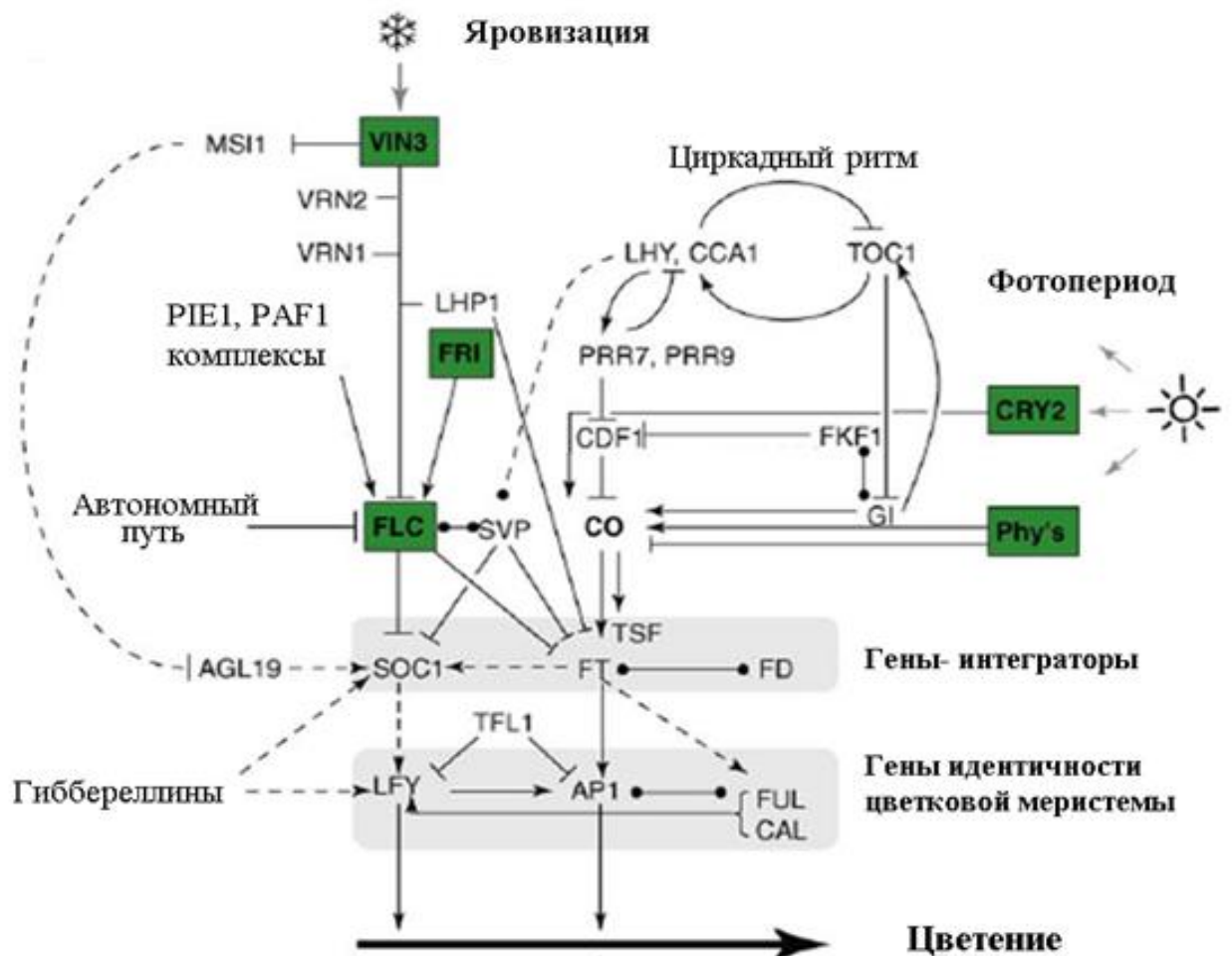


Рис. 18 Генетический контроль времени цветения у *Arabidopsis thaliana* (Jung and Muller, 2009). Индуцирующее влияние показано стрелкой, супрессирующее- линией с чертой на конце. Штриховые линии обозначают гипотетические связи (с точкой на конце- недоказанное влияние на

накопление белка). Линии с точками на обоих концах обозначают межбелковые взаимодействия. Зеленые прямоугольники отмечают гены, определяющие природное разнообразие сроков цветения у арабидопсиса.

Первый этап эпигенетической супрессии происходит по типу посттранскрипционного сайлесинга (Swiezewsky et al., 2009). С 3'-конца *FLC*-гена в направлении 5'-конца считывается некодирующая антисмысловая РНК, которая затем подвергается процессингу. Механизм последующего замолкания гена с помощью этой некодирующей РНК пока не ясен. Вероятно, он происходит через образование siRNA, которая связывается с комплементарными участками мРНК, что вызывает ее последующую деградацию. Снижение экспрессии *FLC* на данном этапе еще не столь значительно и этот процесс является обратимым, поскольку в результате прекращения яровизации экспрессия *FLC* восстанавливается (Swiezewsky et al., 2009). Для закрепления репрессированного состояния в последующих поколениях соматических клеток требуется второй этап, связанный с модификацией гистоновых белков. Было показано, что в основе эпигенетической супрессии *FLC* лежит метилирование лизина в положениях 9 и 27 гистона H3 (Bastow et al., 2004; DeLucia et al., 2008). Процесс модификации гистона H3 индуцируется в результате ассоциации продукта гена *VIN3* с эволюционно-консервативным репрессирующим комплексом белков PR2 (Polycomb Repressive 2) (DeLucia et al., 2008). Аналогичные белковые комплексы участвуют в поддержании репрессивного состояния целого ряда генов растений, животных и человека (Goodrich and Tweedie, 2002; Ringrose 2007; Schwartz and Pirrotta, 2008). В его состав входит ряд белков, в том числе гистон-метилтрансфераза, а также группа PHD (Plant Homeo Domain finger)-белков (*VIN3* и др.), которые отвечают за сайт-специфическое связывание с хроматином (Li et al., 2006). Процесс формирования PR2-комплекса в случае *FLC* гена инициируется в составе 5'-концевого района первого интрона *FLC* (DeLucia et al., 2008). Важную роль в ориентировании и связывании белков комплекса с этим районом играет

протяженная смысловая РНК, синтезируемая внутри интрона 1 (Neo and Sung, 2010). Следует отметить, что это первый пример у растений, где показано участие длинных некодирующих молекул РНК в эпигенетической регуляции. В данный момент не ясно - какие факторы активируют транскрипцию обеих некодирующих РНК под действием яровизации. К концу периода яровизации PR2 комплекс полностью завершает метилирование гистона H3 на протяжении дискретного района FLC (промотор, экзон 1, интрон 1), тем самым закрепляя репрессированное состояние этого гена (Bastow et al., 2004). Данное состояние сохраняется и после прекращения воздействия низкой температуры и обеспечивает снижение уровня экспрессии *FLC*, необходимое для последующего перехода растения в фазу цветения.

Снижение экспрессии *FLC* положительно влияет на экспрессию *FT* (*FLOWERING LOCUS T*)- гена, который интегрирует влияние двух основных факторов: температурного (через *FLC*- ген) и длины светового дня (Рис. 18). При увеличении последнего сигнал поступает через гены циркадного ритма на ген *CO* (*CONSTANS*), что приводит к циклической, зависимой от времени суток активации *FT* (Рис. 18). Под действием короткого дня максимум экспрессии *CO* приходится на ночной период, тогда как под влиянием длинного дня этот максимум смещается в сторону дневного периода. На экспрессию *CO-FT* влияет не только продолжительность, но и качественные характеристики света. Существуют гены фоторецепторов, продукты которых чувствительны к различным длинам волн видимого спектра. Фоторецепторы фитохром А и криптохром 2 (PHYA, CRY2) реагируют на синий и инфракрасный свет изменением своей конформации (Mockler et al. 2003). Когда растение подвержено этим спектрам света во время длинного светового дня, эти фоторецепторы стабилизируют CO- белок в ядре, способствуя его активации и, следовательно, усилению экспрессии *FT* (Turck et al., 2008; Jackson, 2009). Фоторецепторы PHYB, PHYD и PHYE, реагирующие на красный свет, оказывают противоположный эффект, дестабилизируя CO.

Функциональные свойства гена *CO* подтверждают теоретическую модель, которая предполагает определенный циклический ритм чувствительности генов фотопериода (Bunning, 1936). Когда световая активность совпадает с фазой наибольшей чувствительности, соответствующей максимальной экспрессии *CO*,- происходит фотопериодический ответ, связанный с активацией *FT* и индукцией процесса цветения (Рис. 18).

Помимо внешних сигналов: температуры и фотопериода на процесс цветения оказывают влияние внутренние гормональные сигналы, в частности, было показано, что гиббереллины (GA) ускоряют цветение у арабидопсиса (Landridge, 1957) (Рис. 18). Одной из мишеней GA является ген- интегратор *SOC1*, объединяющий сигналы температурного (через *FLC*-ген) и светового (через гены циркадного ритма и *SVP*- ген) путей регуляции. Другой мишенью индуцирующего влияния GAs является ген *LFY* (*LEAFY*), экспрессия которого стимулируется под влиянием экзогенного GA (Blazquez et al. 1998). Данный ген относится к генам идентичности цветковой меристемы (floral meristem identity genes), продукты которых стимулируют переход клеток апикальной меристемы в генеративные клетки цветка. К этой группе генов относятся также *API* (*APETALA1*), *FUL* (*FRUITFULL*) и *CAL* (*CAULIFLOWER*)- гены арабидопсиса, экспрессия которых линейно возрастает в процессе яровизации, что является необходимым условием для перехода к цветению (Winfield et al., 2009) (Рис. 18).

1.4.2. Генетический контроль времени цветения у злаков

У пшеницы и ячменя продолжительность вегетационного периода определяется тремя основными генами: *VRN-1*, *VRN-2* и *VRN-3*, кодирующими транскрипционные факторы регуляции других генов (см. обзоры: Distelfeld et al., 2009; Jung, Muller, 2009). Ген *VRN-1* кодирует MADS- домен содержащий белок сходный с аналогичными белками *API*, *FUL* и *CAL* арабидопсиса и обеспечивающий трансформацию клеток апикальной меристемы стебля в клетки генеративных тканей (Murai et al.,

2003; Shitzukawa et al., 2007). Делеция данного гена приводит к необратимой потере репродуктивной способности. *VRN-2* локус объединяет два сходных *ZCCT*- гена, продукты которых содержат предполагаемые домены: «цинковый палец» (zinc finger) и ССТ- домен. Эти гены являются репрессорами цветения, однако, негомологичны *FLC*- гену арабидопсиса, имеющему сходную функцию. Первоначально предполагалось, что экспрессия *VRN-2* подавляется яровизацией в листьях (Yan et al., 2004). Однако, в более поздних исследованиях было установлено, что главным детерминантом экспрессии *VRN-2* у пшеницы и ячменя является длина светового дня (Dubcovsky et al., 2006; Trevaskis et al., 2006).

VRN-3 ген кодирует ингибитор RAF- киназы с высокой гомологией к продукту *FT*- гена арабидопсиса (Yan et al., 2006). *VRN-3* белок переносится от листьев в апикальную меристему и, подобно белку FT, действует как индуктор цветения, запуская гены идентичности цветковой меристемы (*VRN-1*) (Li and Dubcovsky, 2008). Экспрессия *VRN-3* положительно коррелирует с фотопериодом и происходит только когда *VRN-2* находится в супрессированном состоянии (Distelfeld et al., 2009).

Характер взаимодействия генов *VRN-1*, *VRN-2* и *VRN-3* еще предстоит окончательно выяснить, однако, полученные данные свидетельствуют в пользу модели, которую разделяют большинство исследователей (Distelfeld et al., 2009; Dubcovsky et al. 2006; Trevaskis et al., 2007; Chen et al. 2014). Согласно этой модели, предполагается, что свето- активируемые Pfr- формы белка PhyC (гомо- и гетеро-димеры) действуют в верхней точке трех основных генетических путей регуляции (каскады А, В и С) (Рис. 19). Центральный каскад (А) имеет самый значительный эффект на ускорение цветения под действием фотопериода. Конвергенция PhyC- опосредованного светового сигнала и сигналов циркадного ритма приводит к активации гена *PPD-1*. Последний, в свою очередь, активирует ген *VRN-3*. У пшеницы продукт гена *VRN-3* в клетках апикальной меристемы побегов усиливает экспрессию *VRN-1* гена, находящегося под влиянием яровизации в

компетентном состоянии (см. ниже). Эффекты *VRN-1* транскрипционного фактора подготавливают процесс дифференцировки клеток меристемы в направлении генеративных тканей. *PhyC* также модулирует экспрессию генов циркадного ритма *CO1* и *CO2* (Каскад В). Роль последних у пшеницы окончательно не установлена, но предполагается их действие по аналогии с действием *CO* гена арабидопсиса (см. гл. 1.4.1).

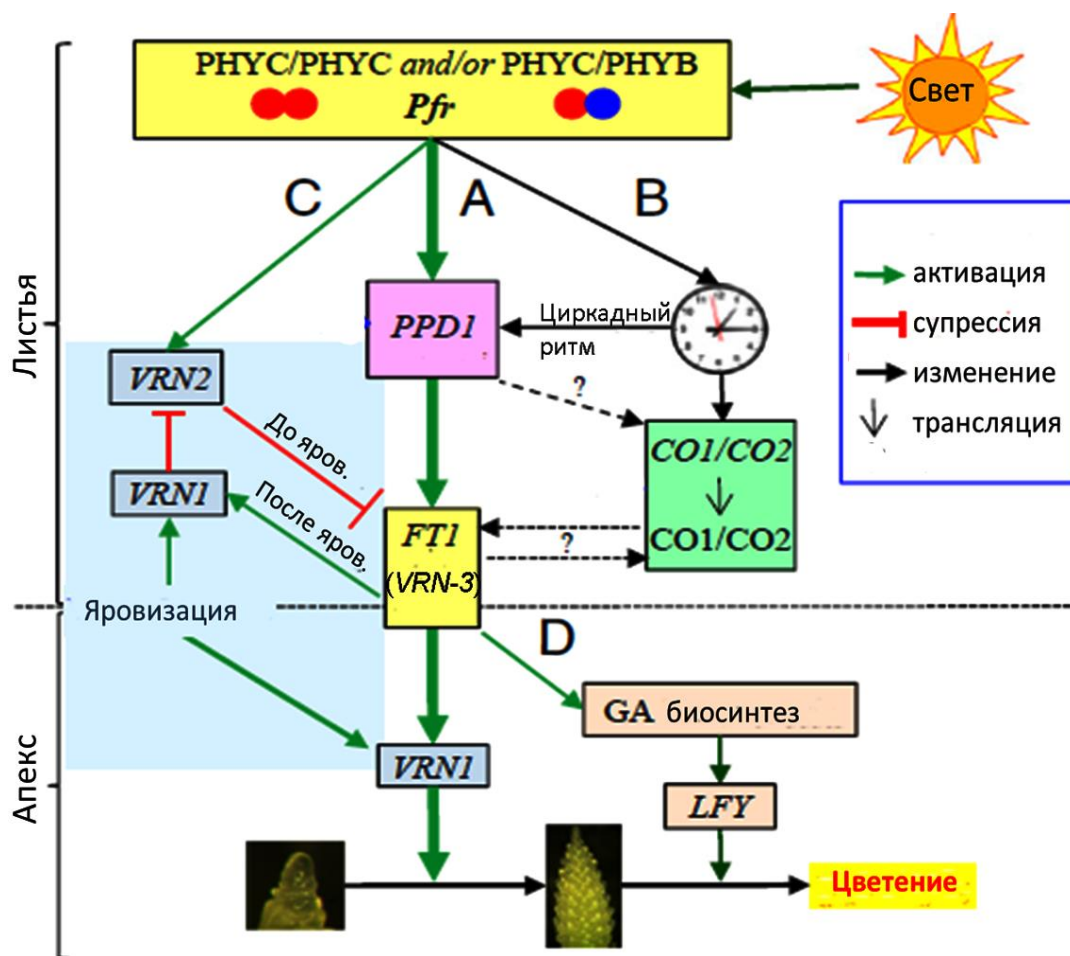


Рис. 19 Модель регуляции цветения у пшеницы под действием удлиненного фотопериода (Chen et al. 2014).

Центральную роль в каскаде С играет репрессор цветения *VRN-2*-функциональный, но не структурный аналог *FLC* гена арабидопсиса. Он выполняет функцию супрессора гена *VRN-3*. Как и *PPD-1* ген, *VRN-2* активируется светом посредством *PhyC*, но продукты этих генов играют конкурирующую, противоположную роль в модуляции экспрессии *VRN-3*,-супрессирующий эффект *VRN-2* в осенний период доминирует над

активирующим эффектом *PPD-1*, что препятствует переходу в фазу цветения. Под влиянием низких температур зимнего периода (яровизации) происходит активация *VRN-1* в листьях и клетках апикальной меристемы. Продукт *VRN-1* в листьях действует в качестве репрессора *VRN-2*. Супрессия *VRN-2* приводит к усилению индуцирующего влияния *PPD-1* на *VRN-3* в условиях длинного фотопериода в весенний период. Активация *VRN-3* в листьях способствует дальнейшей индукции *VRN-1*, замыкая петлю активации процесса цветения под влиянием длинного дня. Дополнительный каскад D в апексе индуцирует транскрипцию *VRN-1*, а также биосинтез и накопление гиббереллина (GA) (Pearce et al. 2013). Одновременное присутствие последнего и продукта *VRN-1* приводит к индукции *SOC-1* и *LFY*, продукты которых требуются для нормального развития колоса (Рис. 19).

Ряд данных показывает, что переход к фазе компетентности к цветению у злаков осуществляется благодаря эпигенетической модификации *VRN-1* гена, что отличает злаки от арабидопсиса (Oliver et al., 2009). У последнего, как было показано выше, индукция аналогичной стадии происходит в результате модификации *FLC*- гена, который не является ортологом *VRN-1* и выполняет противоположную функцию репрессора цветения. Эпигенетическая регуляция *VRN-1* гена у злаков под действием яровизации представляет собой обратный описанному для *FLC* процесс выхода из состояния репрессии, в котором данный ген находился до яровизации. Было показано, что для репрессивного состояния *VRN-1* характерен высокий уровень метилирования лизина 27 гистона H3, как и в случае аналогичного состояния *FLC*- гена (Oliver et al., 2009). В ходе яровизации происходит постепенное деметилирование лизина 27 и увеличение метилирования лизина 4 гистона H3- маркера генетически активного состояния хроматина. При этом никаких изменений в уровне и характере метилирования гистона H3 не было выявлено у генов *VRN-2* и *VRN-3*, что позволило предположить, что *VRN-1* является основной мишенью эпигенетической регуляции генов яровизации у злаков (Oliver et al., 2009). Пока ничего не известно

относительно белковых факторов, осуществляющих процесс активации *VRN-1* и участия в этом процессе некодирующей РНК. Тем не менее, на основе ряда косвенных данных можно сделать предположение, что процесс активации (супрессии) *VRN-1* происходит аналогично тому процессу, который более детально описан в случае *FLC*. В частности, во многих работах было показано важное значение 5'-концевого района первого интрона *VRN-1* в определении чувствительности к яровизации. Делеции в составе этого района (в пределах 2.8 тпн от начала интрона) в большинстве случаев приводят к потере реакции на яровизацию и яровому типу развития (von Zitzewitz et al., 2005; Fu et al., 2005; Cockram et al., 2007). Было высказано предположение, что этот район содержит некий сайт, ответственный за поддержание репрессивного состояния хроматина (Trevaskis et al., 2007). Как и в случае *FLC*- гена этот сайт может отвечать за инициацию специфического белкового комплекса, который осуществляет процесс метилирования (деметиличивания) гистоновых белков. У ячменя было показано, что делеция в начале первого интрона *VRN-1* связана с повышенным относительным содержанием «активной» формы гистона H3 (см. выше) и с более высоким уровнем транскрипции этого гена (Oliver et al., 2009).

Как и в случае *FLC*, эпигенетическая модификация *VRN-1*, по видимому, является устойчивым состоянием, поддерживаемым в поколениях соматических клеток (Distelfeld et al., 2009). Это позволяет сохранить предрасположенность к цветению у озимых форм на протяжении длительного зимнего периода до того момента, когда удлинение светового дня индуцирует переход собственно к процессу цветения (колошения).

Существуют данные, показывающие, что помимо сигналов фотопериода и температуры в регуляции *VRN-3* (а также *VRN-1*) участвуют дополнительные сигналы от различных факторов (стресс, включая осмотический, засуха и др.) (Nelson et al., 2007; Chen et al., 2007). Проводниками действия этих факторов служат гены HAP (HEME

ACTIVATOR PROTEINS)- белков. Указанные белки (HAP2, HAP3, HAP5) в комплексе с ССТ домен- содержащими белками (CO и VRN2), могут связываться с ССААТ- цис-регуляторными элементами промоторов многих генов, в том числе *VRN-3* и *VRN-1* (Ben-Naim et al., 2006; Wenkel et al., 2006). Таким образом, динамическое соотношение различных ССТ- и HAP- белков, входящих в качестве субъединиц в состав сложных комплексов, определяет уровень транскрипции гена- интегратора *VRN-3*, а, следовательно, продолжительность вегетационного периода и время наступления фазы цветения.

Основным геном фотопериодической чувствительности является ген *PPD-1*, который кодирует белок- регулятор псевдоответа (PRR) (Turner et al., 2005). Гены *PPD* дикого типа у пшеницы становятся активными только при достаточном воздействии на растения длинного дня и являются рецессивными по отношению к доминантным аллелям *PPD*, отвечающим за формирование фотопериод- нечувствительных растений. *PPD*- доминантные аллели возникли в результате мутаций, приводящих к экспрессии PRR белка независимо от длины светового дня. Так, например, основной источник скороспелости сортов пшеницы- аллель *PPD-D1a*, возник в результате делеции 2 тпн в промоторном районе гена (Beales et al., 2007). В отличие от пшеницы, у ячменя *H. vulgare* *PPD*- гены дикого типа на удлинившийся весной световой день реагируют слабо, тогда как спонтанный мутант, отобранный человеком- доминантный аллель *PPD-H1* как раз реагирует на длинный день. Таким образом, носители доминантного *PPD-H1* у ячменя- фотопериодически чувствительные и в умеренных широтах рано колосающиеся (Turner et al., 2005).

Гены *VRN-1*, *VRN-3* и *PPD* у пшеницы и ячменя были картированы на хромосомах 5-й, 7-й и 2-й групп, соответственно (см. обзор: Kosova et al., 2008). *VRN-2* локус у пшеницы пока не картирован, тогда как у ячменя он находится на хромосоме 4НL. Наряду с основными *VRN* и *PPD*- локусами у пшеницы и ячменя были идентифицированы дополнительные локусы, чувствительные к действию света и температуры. Дополнительные локусы

ответа на фотопериод были установлены на хромосомах 3D (Miura and Worland, 1994), 6D (Islam-Faridi et al., 1996) и 7BS (Khlestkina et al., 2009) пшеницы. Дополнительные гены ответа на яровизацию расположены на хромосомах 5D (Yoshida et al. 2010), 3B (Miura and Worland 1994), 7A (Law and Worland, 1997) и 6-й группе хромосом (Islam-Faridi et al., 1996). Были картированы ортологичные MADS- содержащие гены ячменя (*HvVRT-2*) и гексаплоидной пшеницы (*TaVRT-2*) на коротких плечах хромосом 7-й группы (Kane et al., 2005). Эти гены, аналогично гену- репрессору *VRN-2*, супрессируются в ходе яровизации. Интересно отметить, что часть локусов ответа на яровизацию могут реагировать и на фотопериод (Danyluk et al., 2003; Dubcovsky et al., 2006; Szucs et al., 2006).

У злаков были также выявлены дополнительные локусы, индуцирующие цветение независимо от сигналов внешней среды (*eps*; *earliness per se*). Множество таких локусов, а также QTL (локусы количественных признаков), влияющие на время цветения были картированы у ячменя (Hackett et al., 1992; Laurie et al., 1995; Kato et al., 2002) и пшеницы (Scarth and Law, 1983; Snape et al., 1985; Miura and Worland, 1994; Kato et al., 2002), и для отдельных локусов были идентифицированы соответствующие гены (Comadran et al., 2012; Zakhrabekova et al., 2012; Alvarez et al. 2016). К тому же было показано, что, многие *eps*- гены могут в действительности проявлять зависимость от внешних факторов (Bullrich et al., 2002; Zakhrabekova et al., 2012).

1.4.3. Гомеологичные гены *VRN-1* у мягкой пшеницы

Высокий потенциал к адаптации у мягкой пшеницы *Triticum aestivum* и ее широкое распространение в различных климатических условиях во многом определяется наличием в одном геноме гомеологичных генов, контролирующих оптимальное время для цветения и созревания. Эта особенность относится ко всем генам, влияющим на указанные признаки, однако, основной вклад вносит *VRN-1* ген, плейотропные эффекты которого

определяют широкое разнообразие по ряду важных физиологических и биохимических показателей (Jung and Muller, 2009; Diallo et al. 2014). У мягкой пшеницы присутствуют три гомеологичных локуса: *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-D1*, расположенные в хромосомах 5A, 5B и 5D, соответственно (Law et al., 1975; Galiba et al., 1995; Dubcovsky et al., 1998). Данная система *VRN-I* генов является ярким примером субфункционализации, или функциональной комплементации генов- гомеологов. Озимая пшеница содержит рецессивные аллели в каждом из указанных локусов, тогда как яровая пшеница, по крайней мере, в одном из них имеет доминантный аллель. Доминантный аллель *VRN-A1* обуславливает полную нечувствительность к яровизации и является эпистатическим по отношению к доминантным аллелям *VRN-B1* и *VRN-D1*, которые обуславливают небольшую чувствительность к яровизации (Pugsley, 1971). Широкое разнообразие времени колошения у яровых пшениц обеспечивается различными сочетаниями доминантных аллелей гомеологичных *VRN-I* локусов, которые также оказывают влияние на высоту растений и урожайность (Goncharov, 2004; Stelmakh, 1993; 1998). Наиболее ранними по времени колошения являются генотипы с тремя доминантными аллелями, однако, они, как правило, являются низкоурожайными. Генотипы с двумя доминантными аллелями *VRN-A1* и *VRN-B1* (*VRN-D1*) созревают несколько позже и имеют более высокую урожайность. Наличие только одного из слабых аллелей *VRN-B1* или *VRN-D1* обеспечивает наибольшую позднеспелость яровых сортов (Pugsley, 1971; Košner and Pánková, 2004).

Серии аллелей каждого из *VRN-I* локусов (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*) были клонированы и исследованы на молекулярном уровне (Yan et al., 2003, 2004a; Fu et al. 2005). В результате было показано, что доминантные аллели этих локусов, обуславливающие переход к яровой форме развития, связаны с мутациями в составе, главным образом, двух регуляторных районов: промоторном и первом интроне. Доминантные аллели *VRN-A1*, связанные с инсерциями или делециями в промоторе, а также с крупной делецией в составе интрона 1 были обозначены как *VRN-A1a*, *VRN-A1b* и *VRN-A1c*,

соответственно (Yan et al., 2004a; McIntosh et al., 2010). Наиболее распространенные доминантные аллели локусов *VRN-B1* и *VRN-D1* (*VRN-B1a* и *VRN-D1a*) содержат крупные делеции в интроне 1, тогда как их промоторные районы не отличаются от таковых у соответствующих рецессивных аллелей этих локусов (Fu et al., 2005; McIntosh et al., 2010).

Предполагается, что мутации в составе промотора или первого интрона *VRN-1* нарушают взаимодействие с регуляторными факторами, что приводит к конститутивной экспрессии *VRN-1* у яровых форм, независимо от температуры окружающей среды (Yan et al., 2003; Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). Первоначально, мутации в составе CArG- подобного мотива *VRN-1* промотора рассматривались в качестве основных детерминантов яровой формы развития у мягкой пшеницы (Yan et al., 2003). Однако позднее этот мотив был найден инвариантным в некоторых генотипах, отличающихся по форме развития (Yan et al., 2004a; von Zitzewitz et al., 2005; Pidal et al., 2009). Кроме этого, поскольку было показано, что ряд доминантных аллелей, содержат только делецию в 1-м интроне (критический район- в пределах 2.8 тпн от начала интрона), то последний район также стал рассматриваться в качестве важного детерминанта яровой формы у пшеницы и ячменя (Fu et al., 2005; von Zitzewitz et al., 2005; Szucs et al., 2007). Выше была представлена модель эпигенетической регуляции *VRN-1*- гена, в которой роль связывания факторов модификации хроматина отводится именно данному району.

Приведенная выше модель регуляции *VRN-1* предполагает, что при наличии в геноме одновременно доминантных и рецессивных гомеоаллелей, только доминантные аллели *VRN-1* будут экспрессироваться в тканях растения при отсутствии яровизации. Это предположение было подтверждено в работе Loukoianov et al. (2005) с использованием изогенных линий мягкой пшеницы, несущих различные доминантные аллели *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-D1*. В этой работе был показан более высокий уровень экспрессии аллеля *VRN-A1*, по сравнению с двумя другими гомеоаллелями,

что, по видимому, лежит в основе его эпистатического влияния на фенотипическое проявление *VRN-B1* и *VRN-D1* (см. выше). В последнее время в литературе появились работы, показывающие наличие нескольких, как минимум 4-х паралогичных копий гена *VRN-A1*, что может оказывать влияние на суммарный уровень транскриптов этого гена и его фенотипическое проявление (Würschum et al., 2015).

Заключение к главе 1.

Аллополиплоидизация является важнейшим фактором эволюции высших растений, обеспечивающим их широкую адаптацию и конкуренцию с диплоидными видами. Условно выделяют две стадии формирования аллополиплоидов: раннюю и более позднюю (диплоидизация). Именно на ранней стадии, в течение нескольких поколений после скрещивания родительских диплоидных видов происходит восстановление фертильности аллополиплоида, что определяет его дальнейшую судьбу в качестве нового вида. Отличительной особенностью ранней стадии является разнообразие цитогенетических и эпигенетических изменений, в дальнейшем обуславливающих высокую фенотипическую вариабельность аллополиплоида. В этой связи важно понять: в какой степени данные изменения являются направленными, а в какой- случайными, каковы механизмы реорганизаций отдельных компонентов генома и в чем заключается функциональное значение этих изменений. Синтетические аллополиплоиды являются уникальным инструментом, позволяющим изучить наиболее ранние и наиболее существенные для последующего выживания стадии формирования аллополиплоидов.

Анализ генома растений позволил выявить ряд компонентов, отличающихся по степени копияности, структурной организации и функциональному значению. Наиболее распространенным компонентом в геномах растений являются МЭ класса LTR ретротранспозонов. Работы по анализу ранних геномных изменений у аллополиплоидов растений выявили

активацию небольшого количества МЭ на фоне основной массы этих элементов, находящихся в неактивном состоянии. Менее изученными являются изменения в этой фракции геномной ДНК на более поздних стадиях, а именно: происходят ли какие-либо процессы реорганизации и перераспределения МЭ между субгеномами в составе цитологически стабильных, фертильных аллополиплоидов и какое функциональное значение имеют эти изменения?

Другой важный компонент- тандемно- организованные последовательности ДНК. Большую часть из них составляют сателлитные повторы гетерохроматина, которые, как показали предыдущие работы, подвергаются количественным изменениям в составе аллополиплоидов. Предстоит выяснить значение этих изменений для генома- носят ли они локальный характер, или же затрагивают и другие компоненты генома в рамках масштабных геномных перестроек? Огромное функциональное значение имеют тандемные повторы, кодирующие структурные элементы белок-синтезирующего аппарата клетки (гены рРНК, тРНК и др.). Предполагается, что поддержание избыточного количества данных генов и их функциональная эксплуатация в составе аллополиплоидного генома является невыгодной для клетки и организма с точки зрения энергетических затрат. В случае генов NOR, кодирующих 45S рибосомальную РНК, эта проблема решается, благодаря феномену «ядрышкового доминирования», или супрессии генов одного из родителей. Однако, до сих пор неизвестно: каковы механизмы этой избирательной супрессии, подвергается ли указанная часть генома каким-либо структурным реорганизациям, начиная с ранних стадий аллополиплоидизации?

Эволюция аллополиплоидов на стадии сформированного, фертильного организма характеризуются непрерывными процессами диплоидизации генома, связанными с редукцией его размера и структурно-функциональной дивергенцией гомеологичных генов. Первоначальными признаками этой дивергенции являются изменения эпигенетического статуса и паттернов

экспрессии генов, приводящие к неаддитивным эффектам и доминированию тех или других генов- гомеологов в различных тканях полиплоидного растения. Эти события в дальнейшем приводят к структурной дивергенции генов, которая закрепляет новые, адаптивно-значимые паттерны их экспрессии (суб- и нео- функционализация). Понимание того,- каким образом структурная дивергенция гомеологичных генов приводит к расширению спектра проявления того или иного фенотипического признака представляет интерес как с эволюционной, так и с генетико-селекционной точки зрения. Особенно это касается такого важнейшего физиологического признака как продолжительность вегетационного периода и связанного с ним срока цветения (колошения). Ключевую роль в контроле данного признака у злаковых растений, в частности, у мягкой пшеницы *T. aestivum* играют гены яровизации *VRN-1*.

Таким образом, настоящая работа направлена, на выявление и анализ геномных изменений в ходе эволюции аллополиплоидов злаков, включая пшеницу, как основной объект. Мишенью для исследования являются различные по своей организации и функциональной роли компоненты генома: диспергированные высоко-повторяющиеся последовательности LTR ретротранспозонов, умеренно-повторяющиеся тандемные повторы, в том числе, кодирующие основной компонент рибосом- рРНК, а также гены *VRN-1*, как модель для изучения процесса дивергенции гомеологичных генов в ходе аллополиплоидизации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Для анализа высокоповторяющихся последовательностей ДНК в геномах диплоидных и полиплоидных видов риса комплекса *Oryza officinalis* использовали коллекцию видов из Национального Института агро-биологических ресурсов (Цукуба, Япония) (табл. 1 приложения).

Материал синтетических аллополиплоидов между представителями родов *Triticum* и *Aegilops* любезно предоставил Проф. М. Фельдман (Институт Вейцмана, Израиль) (табл. 3). Методика получения указанных аллополиплоидов детально описана в работе Ozkan et al. (2001). Растения F₁ (S₀), полученные в результате гибридизации и последующего удвоения хромосом (колхицинирование), подвергались самоопылению. В результате были получены растения S₁, которые снова самоопылялись с образованием поколения S₂ и так далее.

Табл. 3 Используемые в работе синтетические аллополиплоиды *Triticum* x *Aegilops*.

Аллополиплоид	Плоидность	Геномный состав	Изученные поколения (ч-ло растений)
<i>Triticum urartu</i> TL05 x <i>Aegilops longissima</i> TMU06	4X	AAS ¹ S ¹	S ₁ (3)
<i>Aegilops umbellulata</i> TU04 x <i>Aegilops sharonensis</i> TH01	4X	UUS ¹ S ¹	S ₂ (3), S ₃ (2)
<i>Triticum urartu</i> TMU38 x <i>Aegilops tauschii</i> TQ27	4X	AADD	S ₂ (5), S ₃ (10)
<i>Triticum dicoccoides</i> TTD20 x <i>Aegilops tauschii</i> TQ27	6X	BBAADD	S ₂ (3), S ₃ (2)

¹ – Геномные формулы даны в соответствии с Feldman (2001).

Для исследования структурно-функциональной организации различных аллелей локуса *VRN-1* в составе аллогексаплоидной пшеницы *T.aestivum* были использованы изогенные линии пшеницы на основе сорта «Безостая 1», полученные в лаборатории хромосомной инженерии Института цитологии и генетики СО РАН (ИЦИГ СОРАН, Новосибирск) (табл. 4).

Табл. 4 Изогенные линии и гибриды *T.aestivum*, использованные в работе

Название	Описание (ссылка)	<i>VRN-1</i> генотип	Доминантные <i>VRN-1</i> аллели
‘Безостая 1’ (Bz1)	Озимый сорт	<i>vrn-A1vrn-B1vrn-D1</i>	Отсутствуют
i:Bz1 <i>VRN-B1a</i>	NIL (рекуррентный родитель ‘Bz1’, донор – ‘Diamant 2’; Efremova et al. 2011)	<i>vrn-A1Vrn-B1vrn-D1</i>	<i>VRN-B1a</i> (гомозигот.)
i:Bz1 <i>VRN-B1c</i>	NIL (рекуррентный родитель ‘Bz1’, донор – ‘Саратовская 29’; Efremova et al. 2011)	<i>vrn-A1Vrn-B1vrn-D1</i>	<i>VRN-B1c</i> (гомозигот.)
i:Bz1 <i>VRN-A1</i>	NIL (рекуррентный родитель ‘Bz1’, донор – ‘Triple DirkD’; Emtseva et al. 2012b)	<i>Vrn-A1vrn-B1vrn-D1</i>	<i>VRN-A1a</i> (гомозигот.)
F ₁	F ₁ гибридные растения от скрещивания i:Bz1 <i>Vrn-B1a</i> / i:Bz1 <i>Vrn-B1c</i> (Emtseva et al. 2012a)	<i>vrn-A1Vrn-B1vrn-D1</i>	<i>VRN-B1a/VRN-B1c</i> (гетерозигот.)

Нулли-тетрасомные и делеционные линии мягкой пшеницы *T. aestivum* на основе сорта “Chinese Spring” любезно предоставил Проф. Б. Гилл (Канзасский Университет, США). Эти линии были использованы для анализа хромосомной локализации клона ВАС_112D20 в геноме мягкой пшеницы, а также для оценки хромосомной специфичности праймеров к различным гомеологам *VRN-1*.

Для анализа *VRN-1/PPD-D1* генотипов были использованы Европейские яровые сорта мягкой пшеницы из коллекции Федерального Генбанка Института генетики и исследования культурных растений (IPK, Гатерслебен) и российские сорта из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН (табл. 2 приложения).

Анализ аллельного разнообразия генов *VRN-1* у тетраплоидных видов пшеницы: *T. dicoccoides* Thell (BBAA), *T. araraticum* Jakubz. (GGAA) и *T. timopheevii* Zhuk. (GGAA) и их диплоидных предшественников: *T. monococcum* L. (AA), *T. boeoticum* Boiss. (AA), *T. urartu* Tum. ex Gandil. (AA) и *Ae. speltoides* Tausch (BB/GG) проводился с использованием выборки образцов, отобранных из коллекций Института генетики и исследования культурных растений (Гатерслебен, Германия), генбанка ICARDA (Сирия) и Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Вавилова (Санкт-Петербург, Россия) (табл. 3. приложения).

2.2. Нуклеотидные последовательности, ДНК-зонды и праймеры

Для анализа структурной организации высокоповторяющихся последовательностей в геномах различных видов риса (комплекс *O. officinalis*) нами была клонирована и использована в качестве зонда последовательность *pOe49* из генома *O. eichingeri*, содержащая участок INT-домена *gypsy*-подобного LTR ретротранспозона (Shcherban et al., 2000). В дальнейшем, основываясь на ее первичной структуре, были сконструированы специфические праймеры: 5'-CAARGGATGYCGRGANTGYCARG-3' и 5'-UTCNGAУTGNCСRТСNGTУTGNGG-3' для ПЦР-амплификации гомологичных последовательностей из других видов указанного комплекса и последующего анализа их первичной структуры (Shcherban et al., 2001).

Для анализа реорганизации геномной ДНК у синтетических аллополиплоидов пшеницы были использованы синтезированные в ИЦиГ СО РАН 23 праймера к случайно-амплифицируемой полиморфной ДНК (random amplified polymorphic DNA; RAPD) (табл. 4 приложения). Были также

использованы разработанные ранее праймеры к теломерным/ субтеломерным последовательностям злаков: Tel, Sp1L, Sp1R, Sp52L, Sp52R, TrsAL, TrsAR, TrsBL, TrsBR, TrsCL, TrsCR (синтезированы в «Life Tech Co», Япония) (Salina et al., 2004a). Праймеры к 23 микросателлитным (SSR) маркерам Xgwm (Roeder et al., 1998) любезно предоставила докт. М. Рёдер (IPK, Гатерслебен). Праймеры Sa234 (5'-СААСТАГАСГГГААГТААС-3') и Sa237 (5'-СААСТАГАСГГГСТТСТГ-3') были разработаны в настоящей работе (Щербань и др. 2007).

В качестве зондов для анализа рибосомальных генов у синтетических аллополиплоидов были использованы клонированные последовательности: повторяющейся единицы 45S рДНК пшеницы *T.aestivum*- pTa71 (Gerlach and Bedbrook, 1979) и повторяющейся единицы 5S рДНК того же генома- pTa794 (Gerlach and Dyer, 1980).

На основе известных последовательностей 45S рРНК генов *Ae.umbellulata* и *Ae.sharonensis*, выделенных из банка данных NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>), в настоящей работе были сконструированы специфические праймеры (синтезированы в ООО «Биоссет», Новосибирск) для амплификации внешних транскрибируемых спейсерных последовательностей (ETS; external transcribed spacer sequences): PI: 5'-ATGGTCAAGAAACGGTGCC-3'; PII: 5'-ACGCCCATCCTTTCCCAAC-3'; PIII: 5'-AACGGTGTCCSTCGAATGTC-3'; PIV: 5'-TTGGGTCAGAATTTCACTTGG-3'; PV: 5'-TGACTACTGGCAGGATCAAC-3'.

Первоначальный скрининг ВАС-библиотеки *T. aestivum* сорта «Ренан» (Chalhoub et al., 2004), проведенный с использованием тандемных повторов Spelt1 и Spelt52 позволил отобрать ряд клонов, имеющих преимущественно субтеломерную локализацию на хромосомах (Sergeeva et al. 2010). Однако, по результатам FISH, среди этих ВАС-клонов два имели диспергированное распределение на хромосомах В- и D- генома *T. aestivum*: ВАС- клоны 2383A24 и 112D20, соответственно. В данной работе было проведено

субклонирование и полный анализ первичной структуры ВАС-клона 112D20.

Для амплификации районов, фланкирующих сайты встраивания ретротранспозона *Lila* в составе ВАС-клона 112D20, специфичного для D-генома, были сконструированы специфические праймеры: J1forward/ J1reverse (J1F, 5'-GCGTACCAGACCAACGAGCC-3' и J1R, 5'-TTTGGCTTTCTTCAAGAGGG-3') и J2forward/ J2reverse (J2F, 5'-CTTATCCCGTTCCAGGCAC-3' и J2R, 5'-CGAGCAAATTGCAGTCCAAC-3').

Для выделения различных аллелей *VRN-B1* гена из изогенных линий и различных сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, был проведен поиск и сравнение гомологичных последовательностей из баз данных, включающих промоторный и кодирующий районы (номера последовательностей в Генбанке: AY747602, AY747603, AY747604), или промоторный и частичный кодирующий район (AY616453, AY616456). На основании этого сравнения были сконструированы специфические праймеры для амплификации промоторного района *VRN-B1* в пределах 1 тпн от стартового кодона (Pr1: 5'-TACCCSTGCTACCAGTGCCT-3'; Pr2: 5'-GGCCAACCCTACACCCCAAG-3') и первого интрона длиной ~ 3 тпн (Intr1: 5'-ATCATCTTCTCCACCAAGGG-3'; Intr2: 5'-GCGCTCATACCGTTCAAGAA-3'). Для выделения оставшейся части гена, включающей все экзоны и промежуточные интроны были сконструированы праймеры: ex2d: 5'-TTCTTGAACGGTATGAGCGCTAC-3'; ex3r: 5'-CCTTCGCCTTCAGTTTCCCTA-3'; ex3d: 5'-TAGGAAACTGAAGGCGAAGG-3'; ex8r: 5'-GCCCTTCAGCCGTTGATGTGGCTA-3' (Рис. 41).

Для анализа экспрессии генов *VRN-B1* и *VRN-2* с помощью количественной ОТ-ПЦР были использованы специфические праймеры, сконструированные на основе кодирующих последовательностей генов *VRN-A1* (AY747600, AY188331, JF965395, JF965396), *VRN-B1* (AY747602, AY747603, AY747604) и *VRN-D1* (AY747605, AY747606, AB 630964, AB630963). Для оценки геном- специфичности праймеры были тестированы

на нулли-тетрасомных линиях *T. aestivum* сорт 'Chinese Spring' (Shcherban et al. 2013).

Для анализа внутри- и межвидового полиморфизма генов *VRN-1* и *PPD-D1* у представителей родов *Triticum* и *Aegilops* разного уровня плоидности были использованы специфические праймеры к основным регуляторным районам этих генов- промотору, и первому интрону (Табл. 5).

Табл. 5 ПЦР маркеры для идентификации различных аллелей генов *VRN-1* и *PPD-D1*

ПЦР-маркер	Район гена	Праймеры (5'→3')	Аллель(и)*	Ожидаемый размер продукта (пн)	Т отжига (° С)	Ссылки
<i>VRN-A1</i>	Промотор+1-й экзон +начало интрона 1	Vrn1AF: GAAAGGAAAAATTCTGCTCG Int1R: GCAGGAAATCGAAATCGAAG	<i>Vrn-A1a</i> <i>vrn-A1</i> <i>Vrn-A1b</i> <i>Vrn-A1d</i> <i>Vrn-A1h</i> <i>Vrn-A1f1</i> <i>VRN-A1f</i>	876 и 965 734 714 680 734 733 655	50.0	Yan et al. 2004a
<i>VRN-A1</i> делеция	1-й интрон	Ex1/C/F: GTTCTCCACCGAGTCATGGT Intr1/A/R3: AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	<i>Vrn-A1c</i> <i>Vrn-A1L</i>	~500	55.6	Fu et al. 2005
<i>VRN-A1</i> инсерция 0.5 тпн	1-й интрон	Intr1: ATCATCTTCTCCACCAAGGG Intr1-ins1R: AATGAACAGCACGGAAACAG	<i>Vrn-A1ins</i> <i>vrn-A1</i>	1980 1476	50.0	Shcherban et al. 2015a
<i>VRN-A1</i> инсерция 1.4 тпн	1-й интрон	Indel(-)F: CGCTCTTATATTTGTTTACCAGGG Indel(-)R: GGGTCAACTATTCTGTGGAG	<i>VRN-A1ins2</i> <i>vrn-A1</i>	1025 нет продукта	50.0	Shcherban et al. 2015a
Отсутствие делеции в <i>VRN-A1</i>	1-й интрон	Intr1/C/F: GCACTCCTAACCCACTAACC Intr1/AB/R: TCATCCATCATCAAGGCAAA	<i>vrn-A1</i> или <i>Vrn-A1</i> (промотор)	1068	56.0	Fu et al. 2005
<i>VRN-A1</i> инсерция MITE	1-й интрон	Intr 1: ATCATCTTCTCCACCAAGGG Intr1insR : AATGAACAGCACGGAAACAG	<i>VRN-A1f</i> <i>Vrn-A1f-ins</i> <i>Vrn-A1f-del/ins</i>	1480 1910	50.0	Shcherban et al. 2016b
<i>VRN-A1</i> делеция 2.7 тпн	1-й интрон	Intr1/A/F2 : AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA Intr4: GCGCCATTAGGGAGGCACTT	<i>VRN-A1f-del</i> <i>Vrn-A1f-del/ins</i>	~2500	56.0	Shcherban et al. 2016b
<i>VRN-B1</i> <i>T. dicoccoides</i> или <i>VRN-G1</i> Timopheevii	Промотор	P2: TACCCCTGCTACCAGTGCCT P5: GGCCAACCCTACACCCCAAG	<i>vrn-B1/G1</i> , <i>Vrn-B1/G1</i> (интрон) <i>VRN-G1a</i>	968 ~1100	55.0	Shcherban et al. 2015a
<i>VRN-B1(G1)</i> <i>Ae. speltoides</i>	Промотор	P8: CTAGGACTGGCGAGTATCTT P10: GAGAACCGGGCCAACCCTAC	<i>vrn-B1/G1</i> , <i>Vrn-B1/G1</i> (интрон)	~900	55.0	Shcherban et al. 2016b
Отсутствие делеции в <i>VRN-B1(G1)</i>	1-й интрон	Intr1/B/F: CAAGTGGAACGGTTAGGACA или Ex1/C/F: GTTCTCCACCGAGTCATGGT Intr1/B/R4: CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	<i>vrn-B1</i> или <i>Vrn-B1</i> (промотор)	1149 или ~1500	56.4	Fu et al. 2005

<i>VRN-D1</i> делеция	1-й интрон	Intr1/D/F: GTTGTCTGCCTCATCAAATCC Intr1/D/R3: GGTCAGTGGTGGTCTGTGC	<i>Vrn-D1a</i>	1671	61.0	Fu et al. 2005
Отсутствие делеции в <i>VRN-D1</i>	1-й интрон	Intr1/D/F: GTTGTCTGCCTCATCAAATCC Intr1/D/R4: AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	<i>vrn-D1</i>	997	61.0	Fu et al. 2005
<i>PPD-D1</i> маркер	Промотор	Ppd-D1_F: ACGCCTCCCACTACACTG Ppd-D1_R1: GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd-D1_R2: CACTGGTGGTAGCTGAGATT	<i>Ppd-D1a</i> <i>ppd-D1b</i>	288 414	54.0	Beales et al. 2007

*рецессивные аллели- *vrn* (*ppd*); доминантные- *Vrn* (*Ppd*); аллели с неустановленным влиянием на тип развития- *VRN*

Конструирование всех указанных в этой главе праймеров осуществлялось с помощью компьютерной программы OLIGO (Rychlik and Rhoads, 1989).

2.3. Выделение ДНК растений

ДНК выделяли согласно модифицированному методу Plaschke et al. (1995). Растительную массу (листья взрослых растений или 1-3 недельные проростки) весом 50-100 мг помещали в пробирку объемом 1.5 мл, добавляли 200 мкл буфера для экстракции [100мМ Трис-НСl, рН 7.5; 500 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА; 1.25% SDS; 3.8% Na₂S₂O₅; 250 мкг/мл протеиназы К] и измельчали с помощью гомогенизатора. Добавляли еще 500 мкл буфера для экстракции, инкубировали на водяной бане при 55°C в течение 1 часа. Добавляли 700 мкл смеси хлороформ/ изоамиловый спирт (24:1), перемешивали и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин. Для осаждения ДНК отбирали водную фазу в отдельную пробирку и добавляли 1.4 мл 96% этанола, охлажденного при -20°C, затем центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок высушивали на воздухе и растворяли в 50-100 мкл буфера TE [10мМ Трис-НСl, рН 8.0; 1мМ ЭДТА]. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра «SmartSpec™ Plus» (BioRad).

2.4. Выделение ДНК плазмид и ВАС-клонов

ДНК ВАС-клонов и плазмид выделяли методом щелочного лизиса (Birnboim and Doly, 1978) с модификациями. Выращивали культуру бактерий

в жидкой среде LB [на 1 л LB- 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl; pH довели до 7.5] с ампициллином (200-300 мкг/мл) при 37°C в течение ночи при интенсивном встряхивании (140 об/мин).

Переносили культуру в пробирку объемом 2-50 мл (в зависимости от объема культуры) и осаждали клетки центрифугированием в течение 1-3 мин при 6-12 000 об/мин. Осадок мягко суспендировали в 0.1-3 мл раствора I [25мМ Трис-HCl, pH 8.0; 50 мМ глюкоза; 20мМ ЭДТА]. Лизировали клетки добавлением двойного (по отношению к предыдущему раствору) объема раствора II [0.2N NaOH; 1%SDS], перемешивали раствор переворачиванием пробирки 4 раза и выдерживали 5-10 минут при комнатной температуре. К полученному объему добавляли ½ объема 3M ацетата натрия (pH 4.8-5.0) и перемешивали инверсией до формирования творожистого осадка. Центрифугировали 15 минут при 12000 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку и для высаживания ДНК добавляли 2 объема 96%-ого этанола, перемешивали, центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали на воздухе для удаления следов спирта и растворяли в 0.2-1 мл буфера TE [10мМ Трис-HCl, pH 8.0; 1мМ ЭДТА], содержащем 50 мкг/мл РНК-азы А. Пробирку оставляли при 37°C на 30 минут для деградации РНК. Добавляли равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут при 12000 об/мин. Отбирали водную фазу в отдельную пробирку и добавляли 2 объема 96% этанола, охлажденного до -20°C, затем центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в 50-100 мкл буфера TE [10мМ Трис-HCl, pH 8.0; 1мМ ЭДТА]. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра «SmartSpec™ Plus».

2.5. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 50-100 нг ДНК матрицы, 67 мМ Трис-HCl (pH 8.8), 1.8 мМ MgCl₂, 0.01% Tween

20, 18 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. Taq ДНК полимеразы. Условия ПЦР: (1) преденатурация- 2 мин при 94°C; (2) денатурация- 0.5- 1 минута при 94°C; отжиг матрицы с праймерами- 0.5-1 минута при 50-60°C; полимеризация- 0.5-3 минуты при 72°C; число циклов- 35-40; (3) достраивание ПЦР фрагментов- 10 минут при 72°C.

2.6. RAPD-анализ

Для анализа синтетических гибридов между видами *Triticum* и *Aegilops* был использован набор случайных олигонуклеотидов, для которых ранее была продемонстрирована способность генерировать полиморфные RAPD-спектры (Бильданова и др., 2002). Реакционная смесь, помимо случайного праймера в концентрации 0.5 мкМ, содержала компоненты, описанные выше (см. главу 2.5.). Условия ПЦР: (1) 2 мин при 94°C; (2) 30 циклов: 1 минута при 94°C; 1 минута при 37°C; 2 минуты при 72°C; (3) 5 минут при 72°C. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. ПЦР повторяли дважды с каждым праймером.

2.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле. Выделение ПЦР- продуктов из геля

Электрофоретический анализ геномной ДНК, плазмидной ДНК и ПЦР-продуктов проводили как описано ранее (Maniatis et al., 1982), с модификациями. Разделение фрагментов ДНК проводили в 1-2% агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере [40мМ Трис-НСl рН 8.0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА] с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. Наносили в карманы геля по 10-25 мкл реакционной смеси с добавлением 5% глицерина, 0.05% бромфенолового синего и 0.05% ксиленцианола.

В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркеры «100bp» или «1 kb» (ООО Лаборатория МЕДИГЕН). Электрофорез вели

при напряжении 3-7 вольт/см в течение 2-3 часов, затем фотографировали в УФ-свете.

ПЦР-продукты, используемые в дальнейшем для клонирования или секвенирования, вырезали из геля скальпелем и выделяли с помощью набора реагентов «MinElute gel extraction kit» (Qiagen), или набора «БиоСилика» (Санкт-Петербург) в соответствии с инструкциями производителей.

2.8. Блот-гибридизация по Саузерну и CAPS метод

ДНК-зонды метили α -³²P-дНТФ (Amersham Pharmacia Biotech) стандартным методом ник-трансляции (Maniatis et al., 1982) или дигоксигенин-11-дУТФ с использованием набора реагентов «DIG DNA Labeling and Detection kit» (Boehringer Mannheim) в соответствии с инструкцией производителя. 1-5 мкг геномной ДНК растений обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (*Bam*H1, *Eco*RI, *Hind* III, *Hinf* I, *Taq* I, *Hae* III, *Sau*3A, *Msp* I и др.) в течение 16 часов при 37° С. После электрофоретического разделения обработанной ДНК в 1%-ном агарозном геле осуществляли ее перенос на мембрану “HybondN+” (Amersham Pharmacia Biotech) методом капиллярного переноса (Maniatis et al., 1982). В случае зонда, меченного дигоксигенин-11-дУТФ мембраны после переноса ДНК кратковременно отмывали в 2хSSC и выдерживали при 80°С в течение часа для сшивания молекул ДНК с мембраной. Гибридизацию с зондом проводили в течение 16 часов при 65°С в растворе, содержащем 5х SSC, 1% блокирующий реагент (Boehringer Mannheim), 0.02% SDS, 0.1% N-лаурил саркозин. В случае зонда, меченного α -³²P-дНТФ гибридизацию проводили в течение 16 часов при 65°С в растворе: 6х SSC, 0.5% SDS, 5х раствор Денхардта, 10 мкг/мл конкурентной ДНК спермы лосося и 0.5-1 мкг денатурированного меченного зонда. Отмывку мембраны после гибридизации с зондами, меченными α -³²P-дНТФ или дигоксигенин-11-дУТФ проводили в растворе 2хSSC, 0.1%SDS дважды в течение 15 минут,

затем в растворе 0.1xSSC, 0.1%SDS- один раз в течение 15 минут при комнатной температуре. Для увеличения жесткости отмывки температуру последнего раствора повышали до 65°C. Мембраны с радиоактивно-меченным зондом высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой “Кодак” в течении 24-48 часов. Зонд, меченный дигоксигенином визуализировали с использованием хемолюминисценции согласно методике производителя (Boehringer Mannheim).

Для анализа последовательностей рибосомальной ДНК (рДНК), а также *VRN-1* гена с помощью CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)-метода вначале проводили ПЦР-амплификацию со специфическими праймерами. Затем проводили обработку продуктов ПЦР с использованием рестрикционной эндонуклеазы *MspAI*I в течение 1-2 часов при 37° С с последующим разделением фрагментов ДНК в 1% агарозном геле.

Для точной идентификации различных аллелей *VRN-1*, различающихся по промоторному району, соответствующие продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Msp* I, с последующим разделением фрагментов ДНК в 2-3% агарозном геле высокого разрешения. Аллель *VRN-A1f1*, имеющий делецию 1 пн в промоторе *VRN-A1* идентифицировали согласно описанному ранее методу (Dubcovsky et al. 2006).

2.9. Анализ метилирования рДНК

Для анализа метилирования рДНК использовали рестрикционные эндонуклеазы- изошизомеры *Hpa*II и *Msp*I, по разному чувствительные к метилированию цитозина в сайте рестрикции. Каждый образец геномной ДНК был разделен на три аликвоты: одну из них не обрабатывали, две другие гидролизировали с помощью *Hpa* II и *Msp* I, соответственно. Для обеспечения наиболее полной рестрикции брали 3-х кратный избыток фермента и время инкубации увеличивали до 24 часов. Далее проводили ПЦР с каждой аликвотой с использованием специфических праймеров к

нетранскрибируемому спейсеру рДНК (см. главу 2.5.). Продукты ПЦР разделяли в 1.2% агарозном геле.

2.10. Клонирование ПЦР-фрагментов

2.10.1. Очистка ПЦР-фрагментов и лигирование

ПЦР-фрагменты выделяли как описано в гл. 2.7. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра «SmartSpecTM Plus» (BioRad). Затем 50-100 нг очищенного ПЦР-продукта смешивали с 50 нг вектора pDrive и 5 мкл «2xLigation Master Mix» («PCR Cloning plus Kit», Qiagen), доводили объем смеси до 10 мкл бидистиллированной водой. Лигирование проводили в течение 12 часов при 8-12°C. Для остановки реакции смесь инкубировали 10 минут при 70°C и затем использовали для трансформации электрокомпетентных клеток.

2.10.2. Получение электрокомпетентных клеток и трансформация клеток *E.coli* рекомбинантной ДНК

Клетки *E.coli* (штамм XL-blue) выращивали в среде LB при 30°C при интенсивном перемешивании до плотности $D_{600}=0.45$. Охлажденные на льду клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут (4000 об/мин) при 4°C. Осадок клеток промывали суспендированием в 20 мл бидистиллированной воды 3-4 раза с последующим центрифугированием в течение 10 минут (4000 об/мин) при 4°C. Ресуспендировали осадок в 5 мл бидистиллированной воды с глицерином (10%), центрифугировали 10 минут (4000 об/мин) при 4°C. Ресуспендировали клетки в 1.2 мл 10% раствора глицерина. Суспензию клеток расфасовывали по 40 мкл в охлажденные стерильные пластиковые пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Аликвоту 40 мкл электрокомпетентных клеток оттаивали в течение 15 минут на льду и добавляли 1-15 нг рекомбинантной плазмидной ДНК. Переносили раствор в ячейку электропоратора (Eporator^R, Eppendorf). Параметры электропорации: 1.8 kV, 25µF, 200 Ом, зазор ячейки 0.1см. После

импульса вымывали клетки из ячейки 1мл среды LB (без антибиотика) и переносили в стерильную пластиковую пробирку объемом 1.5 мл, инкубировали 30-45 минут при 37°C. Высевали клетки на чашку с агаризованной LB средой, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и Xgal/IPTG (30 мкг/мл и 15 мкг/мл, соответственно).

2.11. Анализ первичной структуры ДНК

Клонированные фрагменты ДНК анализировали с помощью набора для секвенирования «ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer) с использованием универсальных pUC18/M13 прямого и обратного праймеров. В случае анализа ПЦР-фрагментов, полученных со специфическими праймерами и выделенных из геля, использовали соответствующие праймеры. Каждый ПЦР-фрагмент ДНК секвенировали в обоих направлениях. Секвенирующую реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 20-100 нг ДНК-матрицы, 1мкМ прямого или обратного праймера, 2 мкл Big Dye v.3.1 (Perkin Elmer) в следующих условиях: денатурация- 40 секунд при 96°C; отжиг матрицы с праймерами- 30 секунд при 55°C; полимеризация- 4 минуты при 60°C; число циклов- 25.

Полученные в секвенирующей реакции фрагменты ДНК осаждали добавлением ацетата аммония до концентрации 2.5 М и 2.5 объема 96% этанола. Смесь оставляли при комнатной температуре в течение 15 минут, центрифугировали в течение 20 минут при 12000 об/мин. Осадок промывали 250 мкл 80% этанола и сушили на воздухе при комнатной температуре. Высушенный осадок анализировали в центре коллективного пользования СО РАН (Межинститутский центр секвенирования) на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Для просмотра хроматограмм, полученных в результате секвенирования использовались программы CHROMAS (Technelysium Pty Ltd) и SEQUENCE SCANNER 1.0 (Applied Biosystems).

Поиск гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием алгоритмов FASTA и BLAST (Altschul et al.,

1990) в базах данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/), GRAINGENE (<http://wheat.pw.usda.gov/>), TREP (<http://wheat.pw.usda.gov/>) и REPBASE (www.girinst.org). Множественное выравнивание клонированных последовательностей и их кластерный анализ выполнялись с помощью программ Clustal W (version 1.7; Thompson et al., 1994) и MEGA 3.1. (Kumar et al., 2004) при использовании алгоритмов UPGMA и «ближайших соседей» (Neighbor-Joining).

2.12. Субклонирование и анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК ВАС-клона

Субклонирование ВАС-клона с целью анализа его первичной структуры проводили с помощью неполного гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции *Sau3A* и методов случайного фрагментирования (Sambrook et al., 1989; Surzycki, 2000). В последнем случае использовали два подхода: обработку ДНК ВАС-клона ДНКазой I и фрагментирование ДНК с помощью бытового компрессора-ингалятора Omron C-30 (Япония), к которому подключали насадку-небулайзер (Invitrogen, США). Последняя представляет собой специальную камеру с циркулирующим под действием воздушного потока раствором ДНК (5-10 мкг/мл). ДНК ВАС-клона растворяли в TE-буфере, содержащем 10% глицерин. Время циркуляции раствора- 2 мин. Давление воздушного потока – 10-30 psi (фунты/квадратный дюйм). Фрагментированную ДНК, очищенную с помощью набора «MinElute PCR Purification Kit» (Qiagen), лигировали с 50 нг плазмидной ДНК (см. гл. 2.9.1.). Для трансформации методом электропорации использовали высококомпетентные клетки *E.coli* XL-blue MRF+ (Invitrogen). Рекомбинатные колонии отбирали на агаризованной LB-среде с ампициллином (200-300 мкг/мл) и Xgal (40 мкг/мл) /IPTG (50 мкг/мл). Присутствие вставок проверяли с помощью ПЦР колоний. Клоны, содержащие вставки длиной более 200 пн, отбирали для дальнейшего анализа первичной структуры.

Субклонированные фрагменты ДНК секвенировали в одном направлении, если длина вставки не превышала 1 тпн, и в обоих направлениях - в остальных случаях. Использовали универсальные праймеры pUC18/M13 и «ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer). Продукты реакций секвенирования анализировали с помощью ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения контига ВАС 112D20 использовали программу «DNA Dragon Sequence Assembly Software» (<http://www.sequentix.de>). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили с использованием программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). С целью выявления повторяющихся последовательностей в составе ВАС-клона 112D20 с помощью алгоритма BLAST проведен скрининг базы данных TREP (<http://wheat.pw.usda.gov>). При поиске генов использовали программу GenScan (<http://argonaute.mit.edu/GENSCAN.html>). Полная нуклеотидная последовательность ВАС-клона 112D20 длиной 76 327 п.н. аннотирована согласно правилам аннотирования геномных последовательностей пшеницы, разработанным Международным Консорциумом по Секвенированию Генома Пшеницы (<http://www.wheatgenome.org/index.php>).

2.13. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге: при 4°C в темноте и при 23-25°C – в условиях освещения. Для приготовления препаратов использовали корешки 1-1.5 см длиной, которые выдерживали в воде со льдом 16-20 часов, затем фиксировали в смеси 96% этанол/ ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1 от 2 до 14 дней при 4°C. Кончики корешков окрашивали 1%-ным раствором ацетокармина и раздавливали в капле 45%-ной уксусной кислоты. Покровные стекла снимали после замораживания в жидком азоте, и препараты обезвоживали

последовательными промывками 70-, 90- и 96%-м этанолом в течение 5 минут каждая.

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили с использованием рекомбинантных клонов, меченных дигоксигенин-11-дУТФ или биотин-16-дУТФ (Boehringer Roche) с помощью стандартной реакции ник-трансляции (Maniatis et al., 1982). Хромосомные препараты денатурировали в 70%-ном растворе формамида в $2\times\text{SSC}$ при $70-72^\circ\text{C}$ в течение 2 минут, быстро переносили в 70%-ный этанол (охлажденный до -20°C), обезвоживали, проводя через серию спиртов (см. выше) и затем высушивали на воздухе. На каждый препарат наносили гибридизационную смесь (50% формамид, $2\times\text{SSC}$, 10% декстран сульфат), содержащую биотин- и дигоксигенин-меченые зонды в концентрации 5 мкг/мл. Перед нанесением на препарат смесь денатурировали при 80°C в течение 10 минут. Гибридизацию проводили во влажной камере при 37°C в течение 16 часов.

После гибридизации препараты отмывали, проводя последовательно через серию растворов по 5 минут в каждом:

1. 50%-ный раствор формамида в $2\times\text{SSC}$ при 42°C
2. $1\times\text{SSC}$ при комнатной температуре
3. $0,2\times\text{SSC}$ при комнатной температуре
4. $0,1\times\text{SSC}$ при 42°C

Для предотвращения неспецифического связывания флуорохрома на препараты наносили по 100 мкл блокирующего раствора ($4\times\text{SSC}$, 0,1% Tween 20, 3% BSA) и в течение 30-60 минут инкубировали их во влажной камере при 37°C . Детекция биотинилированных зондов проводилась с помощью Су3-авидина (Amersham Pharmacia Biotech) и флуоресцеина (FITC; Sigma). Сигнал гибридизации усиливался с помощью обработки анти-авидин-FITC (Vector Laboratories). Дигоксигенин-меченые зонды детектировали с помощью родамина (Boehringer Roche). В промежутках между этапами детекции препараты отмывали 3 раза по 5 мин в растворе: $4\times\text{SSC}$; 0,1% Tween 20 при 42°C . После последней отмывки препараты

проводили через серию спиртов, высушивали на воздухе и заключали в среду, замедляющую выцветание флуоресцентного сигнала- Vectashield (Vector Laboratories), содержащую 0,5 мкг/мл DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) для окрашивания хромосом. Препараты анализировали с помощью микроскопа “Axioskop” 2 Plus (Zeiss): фильтр №10 для FITC и фильтр №20 для родамина. Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO). Полученные изображения обрабатывались с использованием программы Adobe Photoshop® (Adobe Systems).

Микроскопический анализ препаратов метафазных хромосом проводила И.Г. Адонина в Центре Коллективного Пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск, ИЦиГ СОРАН).

2.14. Выделение РНК растений и обратная транскрипция

Свежесрезанные кончики листьев растений (в каждой повторности- 20 шт.) замораживали в жидком азоте и растирали в порошок в ступке. Выделяли суммарную РНК с использованием набора реагентов «Plant RNeasy Kit» (Qiagen). Выделенную суммарную РНК обрабатывали ДНК-азой и очищали с помощью набора реагентов «RNase-free DNase set» и «RNeasy MinElute Cleanup Kit» (Qiagen). Концентрацию РНК в конечном растворе определяли с помощью спектрофотометра «SmartSpec TM Plus» (BioRad). кДНК синтезировали из 1мкг суммарной РНК с помощью обратной транскрипции, используя олигонуклеотидную затравку (dT)₁₅ и набор реагентов «Omniscript Reverse Transcription kit» (Qiagen). Все процедуры выполнялись в соответствии с инструкциями производителей.

2.15. Количественная ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции

Количественная ОТ-ПЦР (ОТ-ПЦР в реальном времени) проводили с использованием кДНК, взятой в количестве 1/200 объема реакционной смеси, полученной после обратной транскрипции. Реакцию проводили с помощью набора реагентов «QuantiTect SYBR Green Kit» (Qiagen) и системы

«Applied Biosystems 7000 HT» согласно инструкции производителя. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл в следующих условиях: преденатурация- 15 мин при 94°C; денатурация- 15 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами- 30 секунд при 60°C; полимеризация- 30 секунд при 72°C; число циклов- 40; затем снимались показания для построения кривых плавления продуктов ПЦР в условиях: 15 секунд при 95°C; 15 секунд при 60°C; 15 секунд при 95°C.

Анализ данных ПЦР в реальном времени проводился с использованием программы SDS 1.3. с помощью порогового метода сравнения графиков накопления ДНК (Ct) и с определением эффективности ПЦР по последовательным разбавлениям образца. Графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц строились на основе 4-х последовательных 5-кратных разведений. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену *Ubc*.

Количественная ПЦР для каждого образца кДНК проводилась в трех повторностях. В качестве отрицательного контроля проводилась ПЦР с добавлением вместо матрицы бидистиллированной воды, а также РНК, соответствующих тестируемому образцу кДНК (контроль на присутствие геномной ДНК). При использовании РНК и воды вместо матрицы продукты амплификации ни в одном эксперименте не выявлялись.

2.16 Оценка времени колошения

Время колошения различных образцов видов пшениц определялось по 2-3-м повторным экспериментам. Для этого семена растений (не менее 3-х на образец) высаживали в отдельные ряды в теплице Института Цитологии и Генетики СОРАН, без яровизации, в условиях длинного светового дня (12 часов). Определение типа развития пшеницы основывается на методике сравнения исследуемого образца с тестерными яровыми линиями, имеющими наиболее поздний срок выколашивания (Pugsley, 1971;

Goncharov, 2004). Обычно, в качестве таких линий выступают генотипы с одним доминантным *VRN-B1* локусом, при этом их срок до колошения не превышает 90 дней. Следовательно, спустя три месяца после посадки, когда все стандартные яровые сорта уже подверглись выколашиванию, растительный материал оценивался как яровой (есть выколашивание), или озимый (колошение отсутствует).

Для оценки статистической значимости различий по сроку колошения между отдельными образцами (генотипами) использовался критерий Стьюдента (Student's t-test).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Последовательность *gypsy*- ретротранспозона в качестве маркера ди- и полиплоидных геномов комплекса риса *O. officinalis*

Род *Oryza* подразделяется на несколько групп видов (комплексов), среди которых комплекс *O. officinalis* является единственным, содержащим, наряду с диплоидными, аллотетраплоидные виды (Табл. 1 приложения). Следовательно, виды этого комплекса представляют удобную модель для изучения внутригеномных процессов, происходящих при становлении полиплоидных видов. В наши задачи входило выделение и анализ структурной организации повторяющихся элементов генома, пригодных для изучения дивергенции видов комплекса *O. officinalis*, в том числе, его полиплоидных представителей.

3.1.1. Выделение и анализ структурной организации последовательности *gypsy*- ретротранспозона *pOe 49*

Тотальная ДНК видов *O. officinalis*, *O. eichingeri*, *O. punctata* (BB) и *O. australiensis* (EE) была фрагментирована с помощью эндонуклеазы рестрикции *Rsa* I с последующим клонированием в плазмидный вектор. От каждого вида были отобраны 15-20 клонов, дающих наиболее сильный сигнал гибридизации с тотальной ДНК соответствующего вида. Отобранные клоны давали перекрестную гибридизацию с ДНК других видов, причем сила сигнала значительно варьировала в зависимости от вида. Для дальнейшего анализа был взят клон *pOe 49*, дающий одинаково сильный сигнал гибридизации с тотальной ДНК всех видов.

Структура клонированной ДНК *pOe 49* длиной 242 пн была проанализирована и помещена в GenBank под номером AF162178. Поиск с помощью алгоритма BLAST выявил в базах данных множество гомологичных нуклеотидных последовательностей (уровень гомологии > 80%). Для более точной характеристики, был проведен поиск в базах данных

белковых последовательностей с использованием транслированного варианта *pOe 49*. В результате выявлена гомология (20-25%) с интегразным доменом (INT) LTR- ретротранспозонов и некоторых ретровирусов (Рис. 20). Часть консервативного N- концевое ДНК- связывающего участка (C-2-C-29-D), общего для различных элементов этого класса (Suoniemi et al., 1998), была обнаружена в составе *pOe 49*.

```

Del      KMYRNLKINFWWSGIKPEVVEYVSRCLICQQVKADHNNHSQLLGFLPVSEK-WEHILMDFIIGFPLSKRCHDSI 73
Ty3-2   VTLAKISPIYYWPKLQHSIIQYIRTCVQCQLIKSHRPLHSLGFLPIAEGRWLDISMDFVTGLPPTSNNLNMI 74
gypsy   ENIKQVLRDYYFFPKMGS LAKLVVANCRCVCTQAKYDRHPKQELGETPIFSYTGEMVHIDIFS-----TDRKLF 68
HSRV    ATLLKIANLYWFPNMRKDVVKQLGRCQQCLNHNASNKASGPILRPDRPQKP-FDKFFIDYIGPL--PPSQGYLY 71
pOe. 49 MKWLIIRRVGYFWPTMLEDCFRYYKGCRCDCQQFGSIQRAPASAMNPIIKPWP-FRGWIDMIGQINPPSSKGHKY 73
MLV     ALLERSHSPYYMLNRDRTLKNITETCKACAQVNASKSAVKQGTR-VRGHRP-GTHWEIDFTEIK--PGLYGYKY 70
          .  .  .      *  *  .      .      .  *
          Y  WP      C  C  Q      L      ID

```

Рис. 20 Сравнение аминокислотных последовательностей *pOe 49* и соответствующих участков INT- домена некоторых *gypsy*- ретроэлементов и ретровирусов. Аминокислоты идентичные во всех случаях обозначены звездочками и идентичные в 4-5 случаях из 6- точками. Последовательности: *gypsy*- ретротранспозон *D. melanogaster*, P10401; Del- del 1-46 ретротранспозон *Lilium henryi*, X13886; Ty3-2- ретроэлемент *S. cerevisiae*, S53577; HSRV- ретровирус человека, P14350; MLV- вирус лейкемии мыши, P03355 (Shcherban et al. 2000).

С использованием специфических праймеров, фланкирующих интегразный домен *gypsy*- подобных элементов, была проведена ПЦР с тотальной ДНК *O. eichingeri* с последующей гибридизацией с зондом *pOe 49*. Анализ нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта, выявил его высокую гомологию с *pOe 49* и показал, что данный клон с большей вероятностью представляет *gypsy*- подобные элементы, чем элементы суперсемейства *coria* (результат не представлен). Таким образом, было показано, что *pOe 49* является частью интегразного домена Ty3-*gypsy* LTR ретротранспозона. Последний, как показал анализ копийности, относится к умеренно- повторяющимся последовательностям с числом копий, варьирующим в пределах $0.9-4 \times 10^5$ у различных видов комплекса *O. officinalis* (результат не представлен).

Для анализа структурной организации клона *pOe 49* была проведена его блот-гибридизация с геномной ДНК, обработанной эндонуклеазами

рестрикции, в том числе: *Ava*II, *Eco*RV, *Hind*III (Рис. 21). Для последних характерен полиморфный спектр дискретных фрагментов, тогда как другие рестриктазы давали более «смазанную» картину с небольшим количеством фрагментов, что указывает на диспергированный характер организации *pOe* 49. В целом, было выявлено 120 полиморфных фрагментов. Уровень полиморфизма между образцами одного вида был значительно ниже, чем между видами, или между геномами (табл. 6). Генетические расстояния (D) в пределах диплоидных видов варьировали от 0 (*O. punctata*, *O. australiensis*) до 0.1483 (*O. eichingeri*). Для CC-геномных видов среднее межвидовое генетическое расстояние (0.458) было примерно в шесть раз больше, чем среднее внутривидовое (0.075). Среднее межгеномное (при сравнении геномов CC, BB и EE) расстояние составило 0.897. Все геномы, включая диплоидные и аллотетраплоидные (BBCC и CCDD) четко различались по RFLP- спектрам (Рис. 21).

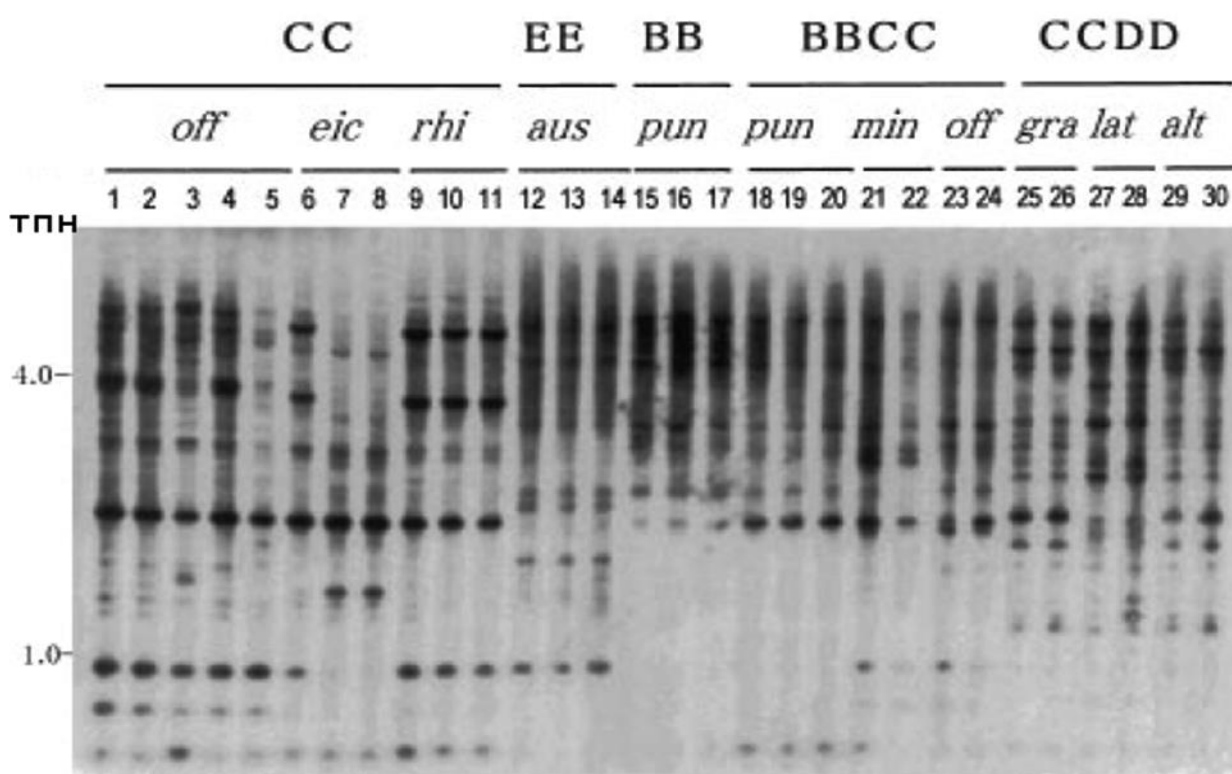


Рис. 21 Блот-гибридизация *pOe* 49 с геномной ДНК видов комплекса *O. officinalis*, обработанной эндонуклеазой *Hind* III. Геномы, виды и образцы указаны сверху рисунка; порядок пронумерованных образцов (1-30) соответствует порядку образцов в табл. 1 приложения (Shcherban et al 2000).

Табл. 6 Внутри- и межвидовые генетические расстояния для диплоидных и тетраплоидных видов комплекса *O. officinalis*.

Геном	Вид	Внутри вида ^а	Между видами ^б	BBCC			CCDD		
				<i>O. punctata</i>	<i>O. minuta</i>	<i>O. officinalis</i>	<i>O. grandiglumis</i>	<i>O. latifolia</i>	<i>O. alta</i>
CC	<i>O. officinalis</i>	0.0740		0.6338	0.5817	0.5403	0.7231	0.6757	0.7231
	<i>O. eichingeri</i>	0.1483		0.4482	0.6338	0.5334	0.7406	0.7336	0.7405
	Sri Lanka		0.4581	0.5000	0.5739	0.5467	0.7403	0.7210	0.7403
	Africa			0.3963	0.6936	0.5200	0.7408	0.7461	0.7407
	<i>O. rhizomatis</i>	0.0042		0.7102	0.6333	0.6324	0.7411	0.7453	0.7715
BB	<i>O. punctata</i>	0.0000	–	0.3778	0.5041	0.4546	0.7827	0.7091	0.8048
EE	<i>O. australiensis</i>	0.0000	–	0.9429	0.8800	0.8824	0.9445	0.9112	0.9445
BBCC	<i>O. punctata</i>	0.0000		0.0000	0.3987	0.2182	0.7544	0.6667	0.7371
	<i>O. minuta</i>	0.0039	0.2066	0.3987	0.0039	0.3050	0.7518	0.6321	0.7390
	<i>O. officinalis</i>	0.0124		0.2182	0.3050	0.0124	0.7143	0.6154	0.6970
CCDD	<i>O. grandiglumis</i>	0.0000		0.7544	0.7518	0.7143	0.0000	0.4627	0.0518
	<i>O. latifolia</i>	0.0000	0.2184	0.6667	0.6321	0.6154	0.4627	0.0000	0.4626
	<i>O. alta</i>	0.0115		0.7371	0.7390	0.6970	0.0518	0.4626	0.0115

^аРасстояния даны для видов, у которых проанализировано более одного образца

^бСреднее генетическое расстояние у видов, относящихся к одному геному

На основе данных RFLP-анализа была построена дендрограмма, на которой диплоидные геномы: CC (*O. officinalis*, *O. eichingeri*, *O. rhizomatis*), BB (*O. punctata*) и EE (*O. australiensis*) образуют отдельные кластеры (Рис. 22). EE- геном является наиболее дивергированным относительно других геномов. Вторым по степени дивергенции является кластер тетраплоидных видов CCDD- генома. Тетраплоидные виды BBCC- генома кластеризуются совместно с образцами диплоидного *O. punctata* (BB), образуя отдельную подгруппу (Рис. 22).

Генетические расстояния, наблюдаемые между различными видами CC- генома (среднее $D=0.458$) примерно в два раза выше генетических расстояний, наблюдаемых внутри тетраплоидных геномов BBCC и CCDD (среднее $D=0.206$ и 0.218 , соответственно) (Табл. 6). Каждый диплоидный вид имеет специфический спектр гибридизации, за исключением образцов *O.*

eichingeri из Африки (Уганда) и Азии (Шри Ланка), которые кластеризуются отдельно друг от друга (Рис. 21,22).

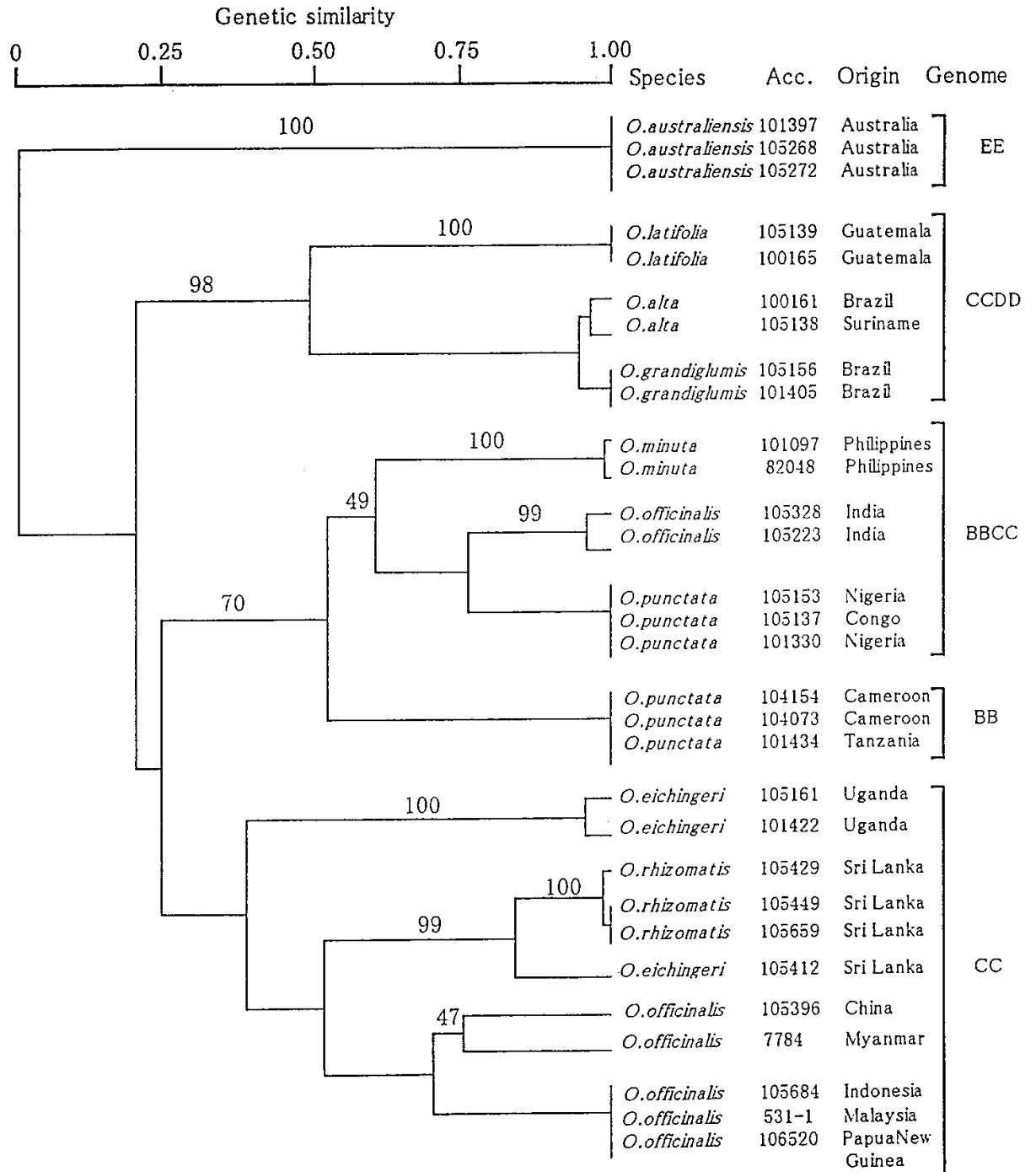


Рис. 22 Дендрограмма на основе RFLP- анализа видов комплекса *O. officinalis* с использованием *pOe 49*. Сверху дана шкала генетического сходства. Справа- названия видов, каталожные номера образцов, происхождение и соответствующие геномы (Shcherban et al. 2000).

Внутри кластера тетраплоидных видов ВВСС- генома можно выделить подгруппу близких видов *O. officinalis* и *O. punctata*, произрастающих в Индии и Африке, соответственно, а также более дивергированный вид *O. minuta* из Юго-Восточной Азии. Относительно СС-генома, тетраплоидный *O. punctata* (ВВСС) наиболее близок диплоидному *O. eichingeri* из Африки ($D=0.396$), который может рассматриваться в качестве предполагаемого донора СС-генома, тогда как донором ВВ- генома, по всей видимости, является диплоидный *O. punctata*, произрастающий на той же территории. Другие тетраплоидные виды ВВСС- генома примерно в равной степени удалены от диплоидных *O. officinalis* и *O. eichingeri* (Табл. 6).

Кластер ССDD- генома является наиболее изолированным от всех других видов комплекса, при этом виды *O. grandiglumis* и *O. alta* имеют практически идентичные спектры гибридизации и обособлены от *O. latifolia* (Рис. 21,22).

Во всех случаях отмечался низкий уровень внутривидового полиморфизма, за исключением вышеуказанных форм *O. eichingeri*, а также экогеографических форм *O. officinalis* из Китая и Мьянмы, отличающихся по RFLP-спектрам друг от друга и от образцов более близких к экватору (Индонезия, Малайзия, Папуа Новая Гвинея) (Рис.21,22). Наиболее удаленными от других представителей СС-генома являются образцы *O. eichingeri* из Африки, тогда как образцы того же вида из Шри Ланки близки к *O. rhizomatis*, произрастающему там же.

3.1.2 Анализ полиморфизма интегратного домена *gypsy*-ретроэлементов среди ди- и полиплоидных видов комплекса *O. officinalis*

Предыдущий анализ структурной организации последовательности рОе 49 у различных образцов комплекса *O. officinalis* позволил построить дендрограмму видов, согласующуюся с морфогенетическими данными (Vaughan, 1994). Это позволило предположить вертикальный характер

эволюции указанной последовательности как в составе диплоидных, так и у полиплоидных видов комплекса. Для оценки степени дивергенции *pOe 49* из различных видов комплекса нами были изолированы последовательности, соответствующие участку INT- домена *gypsy*- ретротранспозона и проанализирована их первичная структура.

Были сконструированы специфические праймеры для амплификации INT- фрагмента, содержащего *pOe 49*, между двумя консервативными сайтами (Рис. 23). С помощью этих праймеров был проведен ПЦР- анализ 13 образцов, представляющих различные геномы изучаемого комплекса (табл. 1 приложения). Все образцы давали ПЦР-продукты, варьирующие по длине от 300 до 350 пн. После клонирования продуктов ПЦР были отобраны рекомбинантные клоны с высокой гомологией к *pOe 49* по сигналу блот-гибридизации.

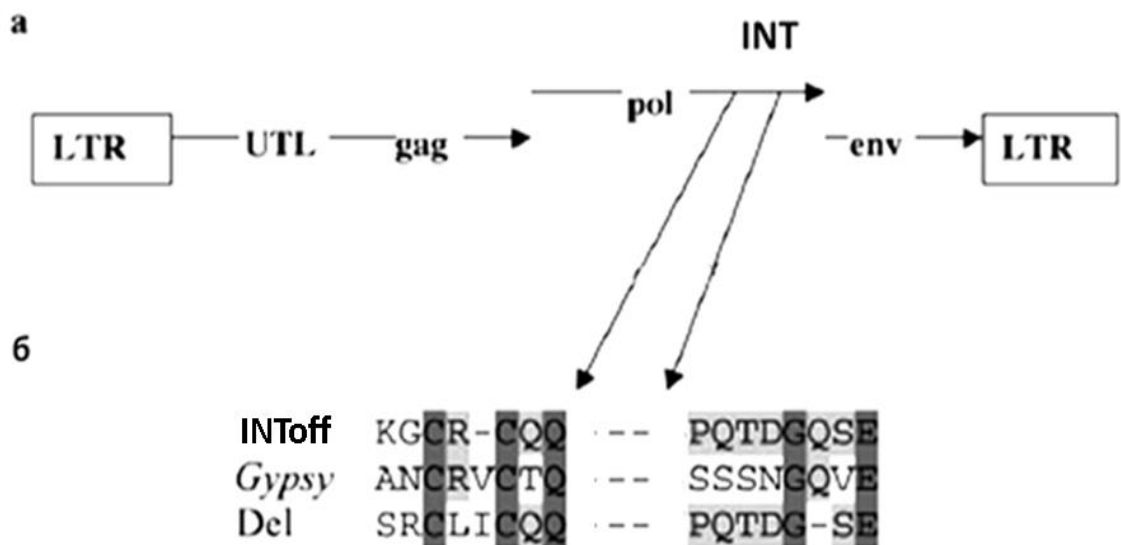


Рис. 23 Схема ПЦР- амплификации фрагмента INT- домена. (а)- Карта *gypsy*-ретротранспозона с указанием LTR, нетранслируемого лидерного участка (UTL), трех ОРС (*gag*, *pol* и *env*), а также INT- домена (Marlor et al., 1986). (б)- сравнение фрагмента INT- домена, ограниченного консервативными сайтами, из различных *gypsy*-ретроэлементов: INToff- проанализированный в этой работе фрагмент из *O. officinalis* (Кат.№100948); *Gypsy*- ретроэлемент *D. melanogaster*, P10401; Del- del 1-46 ретротранспозон *Lilium henryi*, X13886. Идентичные остатки аминокислот закрашены темным, светлым закрашены позиции, в которых идентичны два остатка (Shcherban et al. 2001).

Все клонированные INT- фрагменты были секвенированы и полученные нуклеотидные, а также соответствующие аминокислотные последовательности этих фрагментов помещены в GenBank под номерами AF244753- AF244806. Анализ первичной структуры INT- клонов с последующим поиском гомологии в базах данных выявил их наибольшее сходство с RIRE-2 *gypsy*- подобным элементом риса (Ohtsubo et al., 1999). Гомология INT- последовательностей внутри отдельных геномов комплекса *O. officinalis* составляет 85-90%, тогда как между видами различных геномов- 75-80%. Все клонированные последовательности можно разделить на 2 группы, в зависимости от длины. Первая группа (INT1) включает варианты длиной 351 пн, вторая группа (INT2)- укороченные варианты длиной 292, 281 и 305 пн (последние два были найдены только у тетраплоидных CCDD- видов). Укороченные варианты возникли, судя по всему, в результате делеции ~ 50 пн вблизи сайта отжига обратного праймера и, по видимому, представляют нефункциональный ген.

На основе нуклеотидных последовательностей группы INT1 было построено филогенетическое древо комплекса *O. officinalis* (Рис. 24). На нем можно выделить 3 основные группы: группу I, включающую латиноамериканские виды (CCDD- геном), группу II видов африканского происхождения (СС, ВВ и ВВСС-геномы), за исключением распространенного в Индии вида *O. malampuzhaensis* (син. *O. officinalis* ВВСС) и группу III, включающую, главным образом, азиатские виды (СС и ВВСС- геномы).

Таким образом, полученные нами данные по структурной дивергенции INT-домена *gypsy*-ретротранспозонов указывают на независимую пролиферацию в геномах и вертикальное распространение указанных последовательностей в ходе эволюции видов комплекса *O. officinalis*, включая тетраплоидные виды (ВВСС), наследующие подсемейства ретроэлементов от своих предполагаемых диплоидных предшественников.

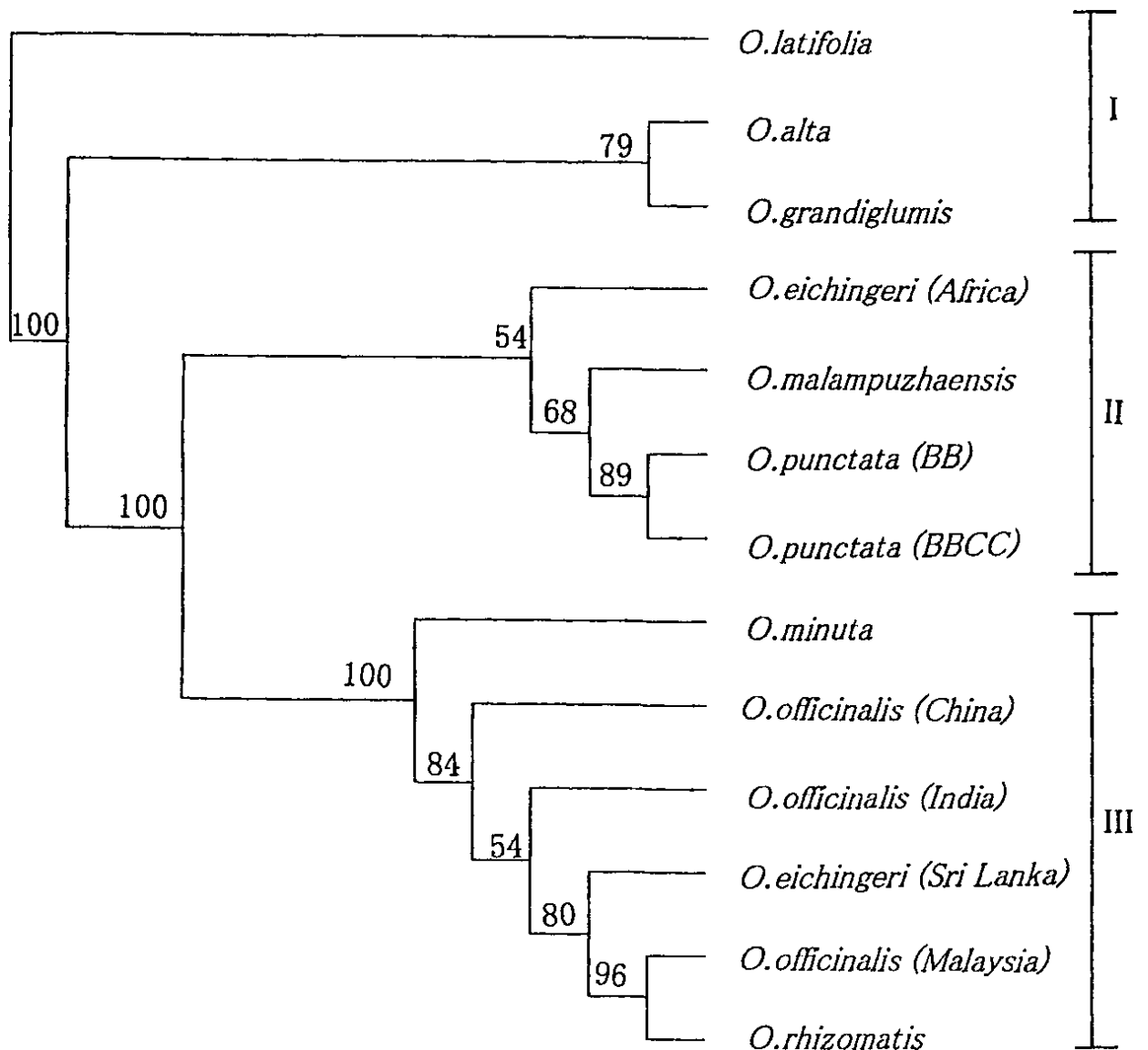


Рис. 24 Дендрограмма комплекса *O. officinalis* на основе анализа нуклеотидных последовательностей INT- домена *gypsy*- ретроэлементов. Для видов, имеющих различные эколого-географические формы (подвиды) в скобках указан регион происхождения (Shcherban et al. 2001).

Заключение к главе 3.1. Нами была впервые изучена структурная дивергенция последовательности *gypsy*- подобного ретроэлемента у диплоидных и полиплоидных представителей комплекса *O. officinalis* риса. На основе RFLP- анализа и данных секвенирования нуклеотидных последовательностей этого элемента у различных видов были построены филогенетические деревья, которые хорошо согласуются с эколого-географической и генетической дифференциацией видов указанного комплекса (Рис. 22,24). Это свидетельствует в пользу преимущественно

вертикального механизма передачи *gypsy*-подобных ретроэлементов в ходе эволюции видов *Oryza*, при этом степень дивергенции последовательностей коррелирует с генетическим расстоянием, разделяющим те или иные виды (подвиды). Последняя закономерность характеризует и взаимоотношения между полиплоидными видами и их предполагаемыми диплоидными предшественниками. Так, аллотетраплоидные виды с геномом BBCC, произрастающие на территориях Африки и Юго-Восточной Азии с высокой вероятностью кластеризуются совместно с BB- и CC- геномными диплоидными видами, которые распространены в тех же районах. Таким образом, структурная организация *gypsy*-подобных ретроэлементов в целом не претерпела значительных изменений в ходе полиплоидизации, что дает возможность использовать последовательности LTR-ретротранспозонов в качестве маркеров для оценки филогенетических отношений между диплоидными и полиплоидными видами.

3.2. Анализ геном-специфичного ретроэлемента в составе D- генома мягкой пшеницы

Из геномной библиотеки мягкой пшеницы *T.aestivum* сорта «Renan» ранее были отобраны 9 BAC-клонов, содержащих субтеломерные повторы (Salina et al., 2009). Среди них, с использованием метода FISH были выявлены 2 клон, имеющие диспергированный геном-специфичный характер распределения: BAC_ 2383A24 и BAC_112D20. Одновременная гибридизация с зондами pSc 119.2 и pAs 1- маркерами В- и D- субгеномов мягкой пшеницы (Schneider et al., 2003) показала преимущественную гибридизацию BAC_ 2383A24 с хромосомами В-субгенома и преимущественную гибридизацию BAC_112D20 с хромосомами D-субгенома. Было сделано предположение, что специфичный характер распределения указанных BAC-клонов в геноме *T.aestivum* обусловлен наличием в них мобильных элементов, амплифицированных в отдельных субгеномах полиплоидной пшеницы.

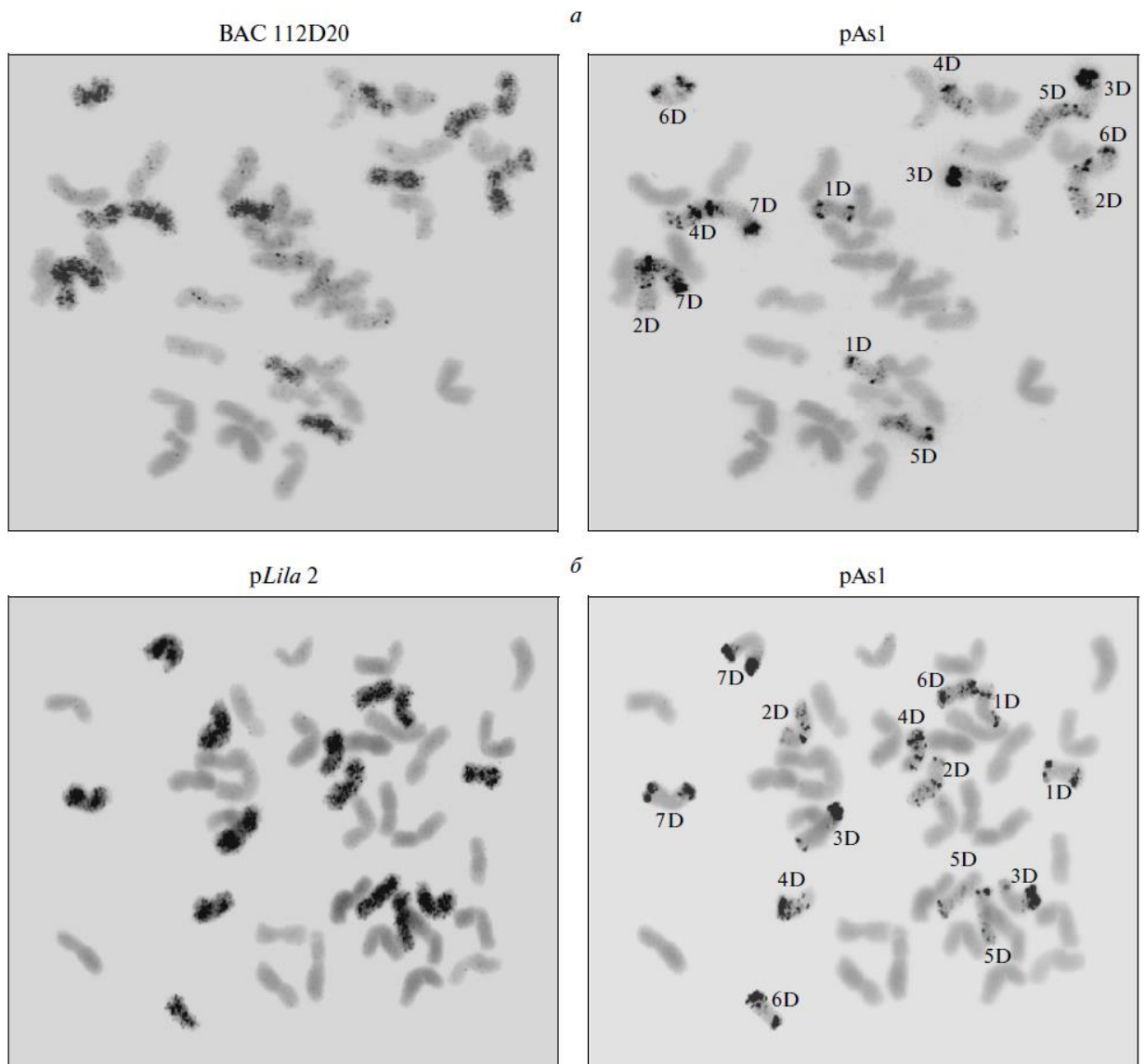


Рис. 25 FISH метафазных хромосом *T. aestivum* (сорт “Renan”) с зондами. а- BAC_112D20 и pAs1 (отдельно); б- pLila2 и pAs1 (Щербань и др. 2012).

Геномную локализацию BAC-клона 112D20 определяли методом FISH BAC-клона и клонированной геном специфичной ДНК с хромосомами *T. aestivum* сорта “Renan”. На Рис. 25а представлен результат гибридизации с двумя зондами – BAC_112D20 и pAs 1 в качестве маркера D- генома мягкой пшеницы. Наиболее интенсивный сигнал гибридизации BAC-клона выявлен на 14 хромосомах, относящихся к D- геному. Аналогичный результат получен и для других сортов мягкой пшеницы: «Chinese Spring» и «Саратовская 29» (результат не представлен). Наряду с этим, на одном

препарате проведена FISH ВАС_112D20 с диплоидными видами: *T. monocosmum* (AA), *Ae. speltoides* (SS) и *Ae. tauschii* (DD). В последнем случае выявлен равномерный сигнал гибридизации на всех хромосомах, тогда как у двух других видов сигнал полностью отсутствовал (результат не представлен). Таким образом, использование в качестве зонда клона ВАС_112D20 позволяет эффективно идентифицировать хромосомы D-генома. Дисперсный характер гибридизации указывает на присутствие в составе ВАС-клона повторяющейся ДНК (МЭ), получившей широкое распространение в D-геноме.

3.2.1. Субклонирование и анализ первичной структуры D-геном специфичного клона ВАС_112D20

Нами проведен детальный анализ первичной структуры ВАС-клона 112D20. Предварительно мы получили библиотеку субклонированных фрагментов ДНК, содержащую 793 клон со вставками размером 0.2-3 тпн. С использованием программы BLAST выявлены и исключены из анализа последовательности вектора pIndigoBAC5 (7.5 тпн) и геномной ДНК *E. coli* (около 7.5% от общего числа субклонов). Оставшиеся субклоны обеспечили 4–6 кратное покрытие вставки ВАС_112D20 размером 76327 пн.

Выявлена высокая насыщенность ВАС_112D20 МЭ, причем преобладали среди них LTR-ретротранспозоны (81.6% общей длины ВАС-клона, табл. 9). Наиболее распространенное суперсемейство *Ty3-gypsy*-подобных элементов занимает 61.7% ВАС-клона. Обнаружены “вложенные инсерции” LTR-ретротранспозонов *Sabrina*, *Carmilla*, *Lila*, *Tar* в другие элементы того же класса: *Fatima*, *WIS*, а также в ДНК-транспозон семейства *CASTA* (Рис. 26).

Класс ДНК-транспозонов представлен единственной копией *CASTA*-элемента *Jorge_112D20-1*, составляющей 16.9% длины ВАС_112D20 (табл. 8). Границы этого транспозона точно определены по наличию повтора *CASTA* в инвертированной ориентации, ограниченного дубликацией сайта-

мишени САА (Рис. 26). Концевые участки Jorge_112D20-1 длиной около 400 пн имеют 96% гомологии с соответствующими участками элемента Jorge_AF326781-1 из генома *T. monosocum*. Внутренняя часть Jorge_112D20-1 имеет лишь частичную гомологию с другими САСТА-транспозонами и включает общий для этих элементов участок, кодирующий транспозазу. В центральную часть элемента Jorge_112D20-1 встроен Ту3-gypsy- ретротранспозон *Lila*_112D20-1 длиной 14 тпн. Он ограничен дубликацией сайта мишени ССТГ и содержит несимметричные LTR. 5'-LTR на 0.4 тпн короче 3'-LTR (1.1 тпн) из-за делеции в центральной части.

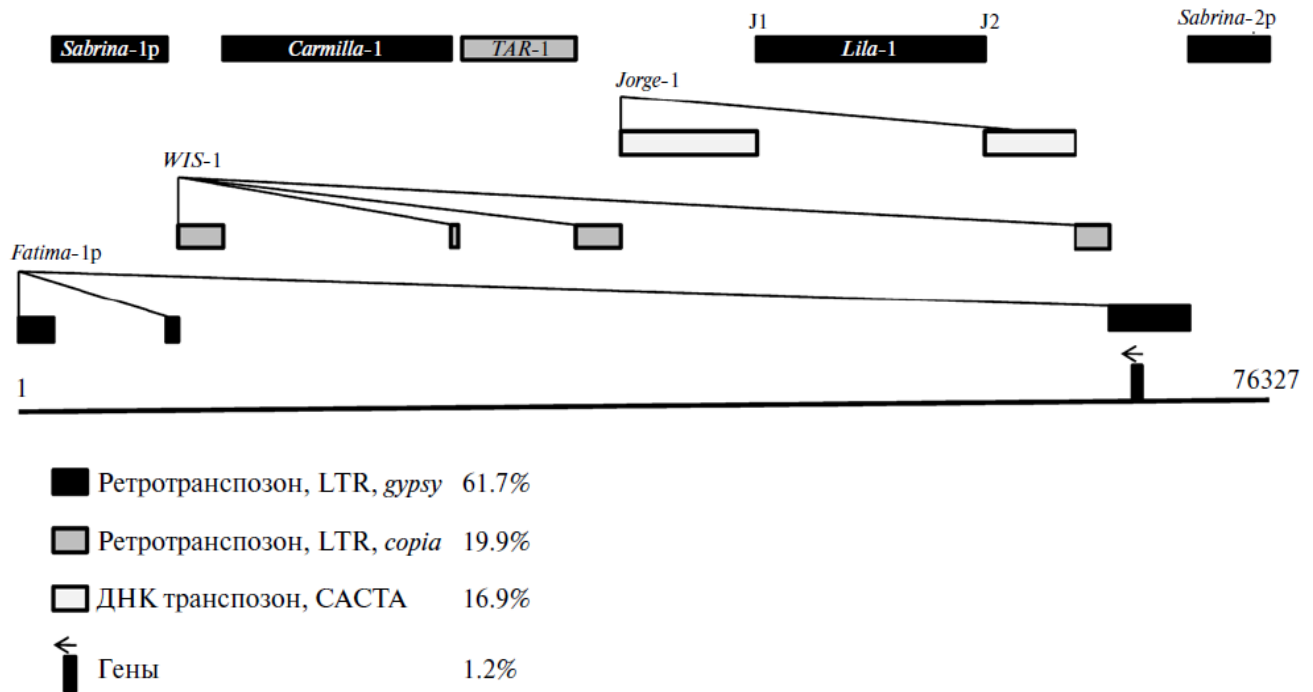


Рис. 26 Структурная организация геномного фрагмента *T. aestivum* длиной 76 327 пн в составе ВАС_112D20. Данный фрагмент содержит D-геном-специфичный ретротранспозон *Lila* (Щербань и др. 2012).

В составе ВАС_112D20 выявлена только одна предполагаемая открытая рамка считывания, не кодирующая МЭ (Табл. 7, Рис. 26). Эта ОРС кодирует последовательность из 307 аминокислотных остатков, которая имеет 49% гомологии с продуктом неизвестного гена *Ae. tauschii*, расположенного вблизи гена устойчивости к листовой ржавчине Lr21 (AF532104.1). Внутри

изучаемого ВАС- клона эта ОРС с обеих сторон ограничена *Ty3-gypsy*-элементом *Fatima_112D20-1p*.

Табл. 7 Элементы, идентифицированные в составе ВАС_112D20.

Класс, суперсемейство, семейство	Число копий	Длина, п.н.	Относительное содержание, %
Класс 1 (LTR-ретротранспозоны)	7	62299	81.6
<i>Gypsy</i>	5	47118	61.7
RLG_ <i>Fatima_112D20-1p</i>	1	7808	
RLG_ <i>Sabrina_112D20-1p, 2p</i>	2	7247, 3647	
RLG_ <i>Carmilla_112D20-1</i>	1	14381	
RLG_ <i>Lila_112D20-1</i>	1	14035	
<i>Copia</i>	2	15181	19.9
RLC_ <i>WIS_112D20-1</i>	1	8509	
RLC_ <i>TAR_112D20-1</i>	1	6672	
Класс 2 (ДНК-транспозоны)	1	12924	16.9
САСТА, DTC_ <i>Jorge_112D20-1</i>			
Гены	1	921	1.2
Неидентифицированные последовательности			0.3

Хромосомную локализацию ВАС_112D20 мы определяли с помощью ПЦР-анализа нулли-тетрасомных и делеционных линий *T. aestivum* с использованием специфических праймеров к районам, фланкирующим сайты встраивания ретротранспозона *Lila* в составе ВАС_112D20 (районы J1 и J2 длиной 402 и 355 пн, соответственно, Рис. 26). ПЦР анализ этих линий позволил установить наличие протяженного фрагмента ВАС_112D20 в составе дистального района хромосомы 5DL (результат не представлен).

3.2.2 *Gypsy*- подобный ретротранспозон *Lila* как специфический маркер D-генома

С целью идентификации нуклеотидной последовательности, специфичной для D- генома, нами проведена сравнительная оценка полиморфизма всех МЭ, входящих в состав ВАС- клона 112D20. Анализ гомологичных последовательностей в банках данных с помощью программы

BLASTN показал, что большинство семейств МЭ этого ВАС-клона широко представлены последовательностями из различных геномов мягкой пшеницы и соответствующих видов-предшественников. Анализ полиморфизма этих семейств указывает на отсутствие выраженной дивергенции между геномами и на значительную перекрестную гомологию (82–95%) между представителями того или иного семейства, выделенными из разных геномов. Единственное исключение представляет *Ty3-gypsy*-ретротранспозон *Lila_112D20-1*. С помощью программы BLASTN найдена только одна последовательность (AF488415.1) из генома *T. monosocum*, гомологичная данному элементу (75–80% гомологии).

Для дальнейшего поиска маркера D-генома мы использовали специфические праймеры к районам J1 и J2 (Рис. 26). С помощью этих праймеров проведен ПЦР-анализ геномной ДНК различных диплоидных и полиплоидных видов Triticeae (Рис. 27). ПЦР-продукты нужной длины обнаружены только у мягкой пшеницы *T. aestivum* и диплоидного вида *Ae. tauschii*. По-видимому, ретротранспозон *Lila* встроился в состав фрагмента, клонированного в ВАС_112D20, после дивергенции диплоидных видов, внутри предка *Ae. tauschii*, и, в дальнейшем, этот участок вошел в состав гексаплоидной пшеницы в результате скрещивания тетраплоидной пшеницы (ВВАА) с предковым видом *Ae. tauschii*-донором D-генома.

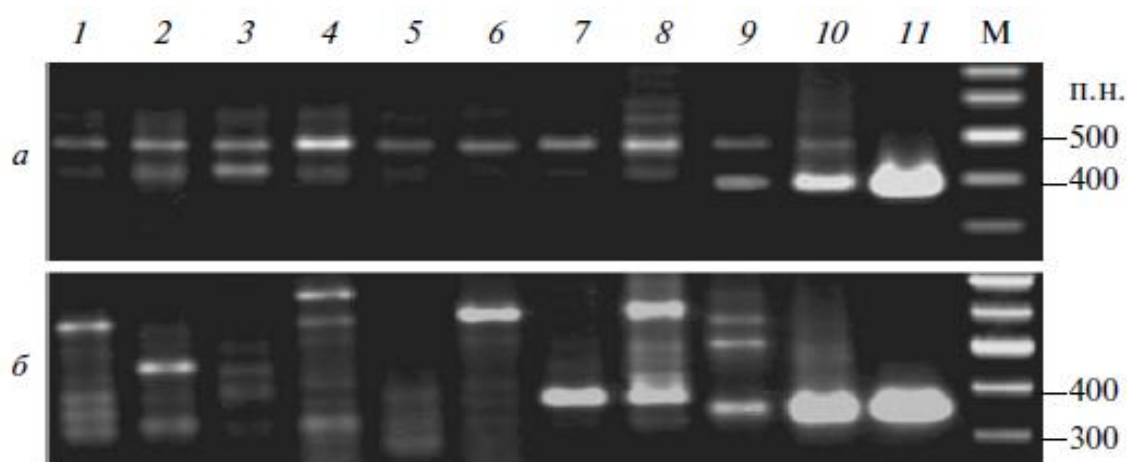


Рис. 27 ПЦР анализ геномной ДНК различных видов Triticeae с использованием специфических праймеров. *а*- к J1 району; *б*- к J2_району. 1-

T. urartu; 2- *Ae.speltoides* TS01; 3- *Ae.speltoides* K389; 4- *Ae.speltoides* TS86; 5- *Ae. umbellulata*; 6- *T.dicoccoides*; 7- *Ae.longissima*; 8- *T.timopheevii*; 9- *T.aestivum* (“Chinese Spring”); 10- *Ae. tauschii*; 11- ВАС_112D20. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использован “100 bp DNA ladder”.

С целью подтверждения специфичности ретротранспозона *Lila* для D-генома нами проведена FISH с отдельными короткими клонированными фрагментами, представляющими различные районы данного элемента: LTR, а также внутренний кодирующий район. Наиболее специфичный сигнал обнаружен при гибридизации последовательности *pLila 2* длиной 1.2 тпн из участка, кодирующего обратную транскриптазу *Lila* (Рис. 256). Таким образом подтверждено, что входящий в состав ВАС_112D20 *Ty3-gypsy*-ретротранспозон *Lila_112D20-1* обуславливает преимущественную гибридизацию этого ВАС-клона с хромосомами D-генома мягкой пшеницы.

Заключение к главе 3.2 В результате скрининга ВАС- библиотеки *T. aestivum* сорта ‘Renan’ был выявлен ВАС- клон 112D20, проявляющий диспергированный геном- специфичный сигнал *in situ* гибридизации с хромосомами D- генома. Нами проведен полный анализ первичной структуры данного ВАС- клона (76 327 пн). Для него характерно высокое содержание *gypsy*- LTR- ретротранспозонов (61.7%) и низкое содержание генов (1.2%). Анализ баз данных нуклеотидных последовательностей, гомологичных выявленным в составе ВАС_112D20 LTR- ретро-транспозонам, с последующей FISH отдельных субклонов позволили установить, что *gypsy*- LTR- ретротранспозон *Lila_112D20-1* обуславливает D- геном- специфичность ВАС_112D20. Данные *in situ* гибридизации и ПЦР-анализа различных видов Triticeae свидетельствуют о том, что указанный ретроэлемент подвергся амплификации внутри предкового вида *Ae. tauschii*, донора D- генома.

3.3. Анализ ранних геномных изменения в ходе аллополиплоидизации с использованием модели синтетических амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops*

С помощью различных методических подходов нами был проведен анализ в составе синтетических амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops* последовательностей геномной ДНК, различающихся по типу организации и функциональной роли, включая субтеломерные, микросателлитные (SSR), случайно амплифицируемые последовательности ДНК (RAPD), а также гены рибосомальной РНК. В качестве объекта для анализа первых трех типов последовательностей был использован синтетический амфиплоид *Ae. longissima* TL05 x *T. urartu* TMU06 (TL05 x TMU06) первого поколения. Для анализа генов 45S рРНК был взят синтетический амфиплоид *Ae. sharonensis* TH01 x *Ae. umbellulata* TU04 (TH01 x TU04); тогда как анализ генов 5S рРНК проводили с использованием 3-х синтетических амфиплоидов (Табл. 3).

3.3.1. Геномные изменения на ранних стадиях образования амфиплоида *Ae. longissima* x *T. urartu*

Для оценки геномных изменений в субтеломерных районах в процессе аллополиплоидизации использовали ПЦР с праймерами, разработанными к данным районам. Всего было использовано 66 пар праймеров, комбинированных из 11 праймеров к субтеломерным последовательностям. В большинстве случаев ПЦР-спектры аллополиплоида TL05 x TMU06 представляли собой совокупность фрагментов, амплифицируемых у обоих родителей. Появление новых ПЦР-фрагментов у изучаемого аллополиплоида TL05 x TMU06 не было обнаружено. В трех случаях наблюдался полиморфизм- существенное уменьшение интенсивности амплифицируемого фрагмента у аллополиплоида по сравнению с родительскими формами. Для подтверждения указанного полиморфизма была проведена Саузерн-гибридизация спектра ПЦР с вырезанными из геля фрагментами ДНК. Элиминация ПЦР-фрагмента длиной около 500 пн была подтверждена Саузерн-гибридизацией только для одной пары праймеров Tel/Sp52R (Рис.

28). Последовательность ДНК (Tel-Sp52R-500), амплифицируемая в геноме *T. urartu* и отсутствующая в ПЦР-спектре аллополиплоида TL05 x TMU06, была клонирована. Анализ первичной структуры этой последовательности (№ в Генбанке - DQ304632) не выявил существенной гомологии к теломерным повторам и к субтеломерной последовательности Spelt52. Высокий уровень гомологии (96-98%) обнаружен у Tel-Sp52R-500 с тремя последовательностями ДНК пшеницы, расположенными в хромосомах 4-й группы (4AL, 4BS, 4DS). Одна из них (4DS) идентична последовательности мРНК *Ae. tauschii* (XM_020309779.1), кодирующей транскрипционный SEUSS-подобный фактор, участвующий в регуляции цветения и эмбрионального развития (Бао et al. 2010). Для данной последовательности обнаружена соответствующая EST мягкой пшеницы, выделенная из колоса на стадии раннего цветения (BJ315318).

Изучение организации последовательности Tel-Sp52R-500 в геномах *Ae. longissima*, *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *T. aestivum* с помощью Саузерн-гибридизации выявил дисперсную картину гибридизации в каждом случае. (результат не представлен). Таким образом, при образовании аллополиплоида TL05 x TMU06, в родительском геноме *T. urartu* произошла мутация в последовательности ДНК (либо её полная делеция, либо мутация(и) в сайтах отжига праймера(ов), расположенной в 4-й хромосоме и, предположительно, относящейся к мультигенному семейству SEUSS-подобных транскрипционных факторов.

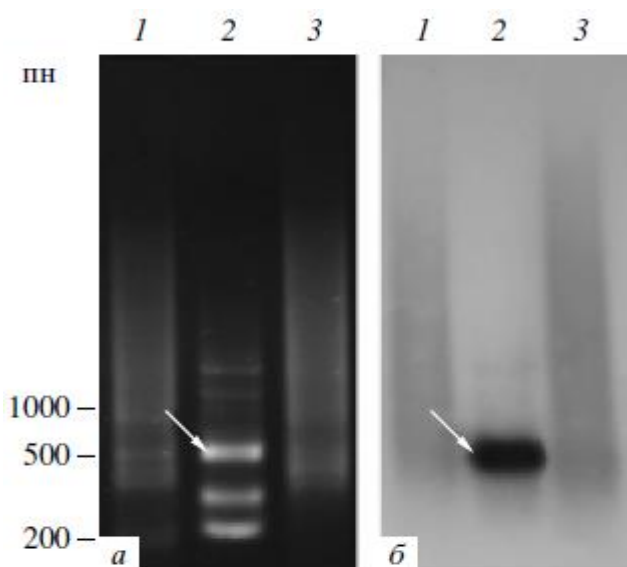


Рис. 28 Электрофорез продуктов ПЦР (а), полученных с использованием пары праймеров Tel/Sp52R, и гибридизация спектров ПЦР с зондом Tel-Sp52R-500 (б). ПЦР проводили с геномной ДНК: 1 - TL05, 2 - TMU06, 3 - TL05 x TMU06. Клонированный фрагмент длиной около 500 пн указан стрелкой (Щербань и др. 2007).

3.3.1.1. RAPD-анализ

Изучение геномных перестроек у аллополиплоида TL05xTMU06 первого поколения проводили также путем сравнения ПЦР-спектров, полученных при амплификации геномной ДНК аллополиплоида и его родителей с использованием RAPD-праймеров (Табл. 4 приложения). Всего при амплификации ДНК родителей *T. urartu* TMU06 и *Ae. longissima* TL05 с 38 праймерами было получено 375 RAPD-фрагментов, из которых 92-специфичны для генома *T. urartu* и 79 - для генома *Ae. longissima*. В большинстве случаев RAPD-фрагменты, специфичные для родителей, были выявлены у аллополиплоида TL05 x TMU06. В то же время 12 ПЦР-фрагментов, полученных при амплификации с праймерами R032, R036, R092, R158, R160, R187, R194 геномной ДНК *T. urartu*, и 18 фрагментов, полученных при амплификации с праймерами R036, R057, R068, R091, R092, R160, R181, R182, R221 геномной ДНК *Ae. longissima*, не присутствуют в геноме аллополиплоида TL05 x TMU06 (Табл. 4 приложения, Рис. 29). Следует отметить, что новых фрагментов амплификации в геноме экспериментально полученного аллополиплоида при сравнении с RAPD-спектрами родительских форм не выявлено.

Для более детального анализа геномных перестроек, приводящих к изменениям в RAPD-спектрах аллополиплоида относительно родительских форм, было проведено клонирование и секвенирование фрагмента ДНК *Ae. longissima* длиной 600 пн. Данная последовательность ДНК (R068-TL05-600) интенсивно амплифицировала при использовании праймера R068 и геномной ДНК *Ae. longissima* TL05 в качестве матрицы, но отсутствовала у изучаемого аллополиплоида (Рис. 29а). При гибридизации клонированной последовательности R068-TL05-600 с соответствующими ПЦР-спектрами было показано, что помимо сильного сигнала гибридизации с RAPD-фрагментом идентичной длины, содержащим данную последовательность, выявляется более короткий фрагмент, гомологичный данному зонду (Рис.

296). Существенно более слабый сигнал гибридизации был отмечен для этих фрагментов в ПЦР-спектре аллополиплоида TL05 x TMU06.

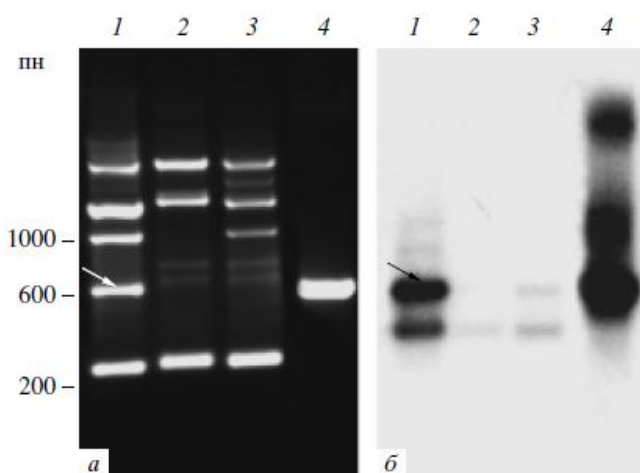


Рис. 29 ПЦР с RAPD-праймером R068 (а) и гибридизация спектров ПЦР с зондом R068-TL05-600 (б). ПЦР проводили с геномной ДНК: 1 - TL05, 2 - TMU06, 3 - TL05 x TMU06, 4 - контроль (плазмида R068-TL05-600). Клонированный фрагмент длиной около 600 пн указан стрелкой (Щербань и др. 2007).

Сравнение первичной структуры клонированной последовательности ДНК R068-TL05-600 с известными последовательностями из баз данных выявил значительную гомологию (98%) с последовательностью контига IWGSC_chr2BS_ab_k71_contigs_longerthan_200_5203409, расположенного в хромосоме 2BS. Данная последовательность, по видимому, не является кодирующей, поскольку имеет перекрестную гомологию (80-92%) с рядом других последовательностей, расположенных на разных хромосомах в районах локализации LTR ретроэлементов.

Была подобрана пара праймеров Sa234 и Sa237 длиной 21 пн к концевым областям R068-TL05-600. ПЦР с использованием данных праймеров не обнаружил каких-либо различий между образцами ДНК *Ae. longissima* TL05, *T. urartu* TMU06 и аллополиплоида TL05xTMU06; фрагмент ДНК длиной около 600 пн амплифицировался у каждого из трех образцов. Это указывает на то, что RAPD-полиморфизм, выявленный с помощью праймера R068, обусловлен скорее точечной мутацией в месте отжига праймера, а не элиминацией последовательности R068-TL05-600 в геноме аллополиплоида. Это также подтвердилось в ходе Саузерн-гибридизации последовательности R068-TL05-600 со спектрами эндонуклеазного гидролиза геномной ДНК

аллополиплоида TL05 x TMU06 и родительских линий, не выявившей полиморфизма между изученными линиями (данные не показаны).

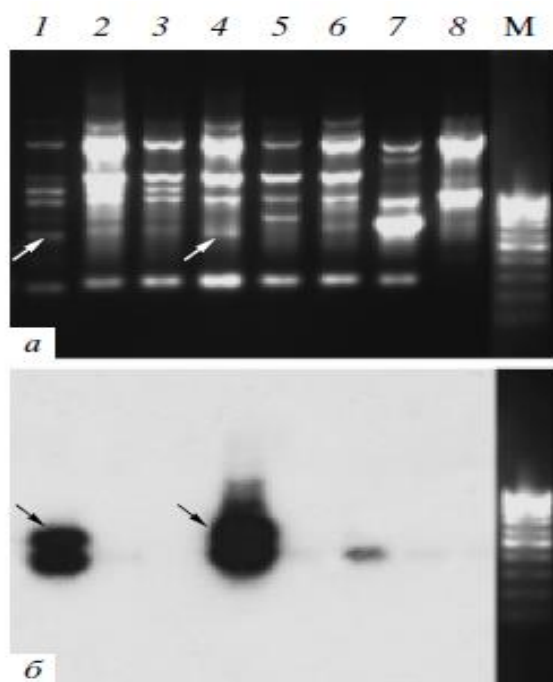


Рис. 30 ПЦР с RAPD-праймером R068 (а) и гибридизация спектров ПЦР с зондом R068-TL05-600 (б). ПЦР проводили с геномной ДНК: *Ae. longissima* (1 - TL15; 2 - TL09; 3 - TL04; 4 - TL03), *Ae. sharonensis* (5 - TH02; 6 - TH01), *Ae. tauschii* (7 - TQ27), *T. monococcum* (8 - TMB02). ПЦР-фрагмент длиной около 600 пн указан стрелкой. М - маркер молекулярной массы "100 пн" (Щербань и др. 2007).

С помощью Саузерн-гибридизации зонда R068-TL05-600 с RAPD-спектрами, полученными при амплификации ДНК различных видов *Triticum* и *Aegilops* с праймером R068, было обнаружено, что два фрагмента гибридизации, характерных для *Ae. longissima* TL05, выявляются также у образцов *Ae. longissima* TL03 и TL15 (Рис. 30). Для остальных изученных образцов видов *Triticum* и *Aegilops* фрагменты гибридизации с последовательностью R068-TL05-600 практически отсутствуют. Полиморфизм между данными образцами *Triticum* и *Aegilops* не выявляется при использовании праймеров, специфичных к последовательности R068-TL05-600.

3.3.1.2. SSR- анализ

Микросателлитный (SSR) анализ позволяет выявлять полиморфизм участков генома, ограниченных тандемными повторами с повторяющейся единицей 2-6 пн. Поскольку праймеры к микросателлитной ДНК видов *Ae. longissima* и *T. urartu* не были разработаны, то использовались SSR-маркеры

близкородственных видов. Для микросателлитного анализа аллополиплоида TL05 x TMU06 и его родителей были использованы пары праймеров (Xgwm), разработанные для SSR-локусов *T. aestivum* (геном VBAADD) (Roeder et al., 1998). ПЦР проводили с праймерами, для которых было показано, что их можно использовать для анализа видов злаков с геномами A или S (Adonina et al., 2005; Salina et al., 2006).

SSR-маркер	<i>Ae. longissima</i> (TL05)	<i>T. urartu</i> (TMU06)	TL05 x TMU06
Xgwm033-1A	–	116	116
Xgwm905-1A	–	224	224
Xgwm095-2A	–	110	110
Xgwm155-3A	–	133	133
Xgwm165-4A	–	192	192
Xgwm179-5A	–	180	180
Xgwm186-5A	–	100	100
Xgwm666-5A	–	84, 107, 120	84, 107, 120
Xgwm982-5A	–	93	93
Xgwm276-7A	94	94, 101	94, 101
Xgwm631-7A	–	170	170
Xgwm018-1B	–	170	170
XTaglgap-1B	256	–	256
Xgwm264-1B	160	160	160
Xgwm1078-1B	162	162	162
Xgwm526-2B	–	128	128
Xgwm619-2B	123	123	123
Xgwm389-3B	116	–	116
Xgwm533-3B	111	–	111
Xgwm165-4B	255	–	255
Xgwm513-4B	164	–	164
Xgwm577-7B	133	–	133
Xgwm437-7D	96	–	96

Табл. 8 Длина в пн фрагментов амплификации, полученных с использованием SSR-маркеров мягкой пшеницы у амфиплоида TL05xTMU06 и его родителей (Щербань и др. 2007).

Всего было использовано 23 пары праймеров для амплификации ДНК аллополиплоида TL05 x TMU06, *Ae. longissima* TL05 и *T. urartu* TMU06 (Табл. 8). Продукты амплификации для *T. urartu* и *Ae. longissima* были получены при использовании 16 и 11 пар праймеров, соответственно. Общие для обоих видов продукты амплификации получены только при использовании четырех пар праймеров из 23. Изменений длины всех изученных микросателлитных локусов у аллополиплоида по сравнению с родительскими растениями обнаружено не было.

Таким образом, в изученной нами гибридной комбинации длина микросателлитных локусов не изменяется в результате амфиплоидизации относительно исходных родительских растений.

3.3.2. Анализ генетических и эпигенетических изменений генов 45S рРНК у амфиплоида *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata*

Предварительно, с помощью С-окрашивания хромосом был проведен анализ кариотипов синтетического амфиплоида ТН01 x ТУ04 и соответствующих родительских видов. Анализ образца ТН01 *Ae. sharonensis* выявил нормальный кариотип, характерный для данного вида (Badaeva et al., 1996a). Образец ТУ04 *Ae. umbellulata* содержал реципрокную транслокацию участка короткого плеча хромосомы 1U (включая сателлит) на короткое плечо хромосомы 2U (1U:2U). Вновь образованная хромосома 1U:2U была сходна по длине, соотношению плеч и наличию NOR с хромосомой 5U, но имела более крупный сателлит. Анализ методом С-окрашивания амфиплоида ТН01 x ТУ04 выявил отсутствие каких-либо кариотипических изменений по сравнению с диплоидными родителями. Геном амфиплоида, как и ожидалось, содержал вышеописанную транслокацию.

Наряду с С-окрашиванием Бадаева Е.Д. (Институт общей генетики РАН) выполнила окрашивание серебром с целью определения ядрышковой активности у синтезированного амфиплоида ТН01 x ТУ04 и его диплоидных родителей. В результате было обнаружено отсутствие сигнала окрашивания на хромосомах S^{sh} субгенома у амфиплоида, что доказывает супрессию ядрышковых организаторов данного субгенома в ответ на аллополиплоидизацию.

3.3.2.1. Локализация 45S рДНК на хромосомах

Для локализации 45S рДНК на хромосомах у амфиплоида ТН01xТУ04 (S_2 - S_4 растения) и диплоидных родителей, мы проводили FISH с использованием зонда рТа 71 на препараты метафазных хромосом. Два

крупных сайта рДНК были установлены у диплоидных *Ae. umbellulata* и *Ae.sharonensis* (Рис. 31а,б). Сигнал на хромосоме $5S^{sh}$ *Ae.sharonensis* был сильнее сигнала на хромосоме $6S^{sh}$, тогда как в геноме *Ae. umbellulata* сигналы на обоих NOR-содержащих хромосомах были сходными.

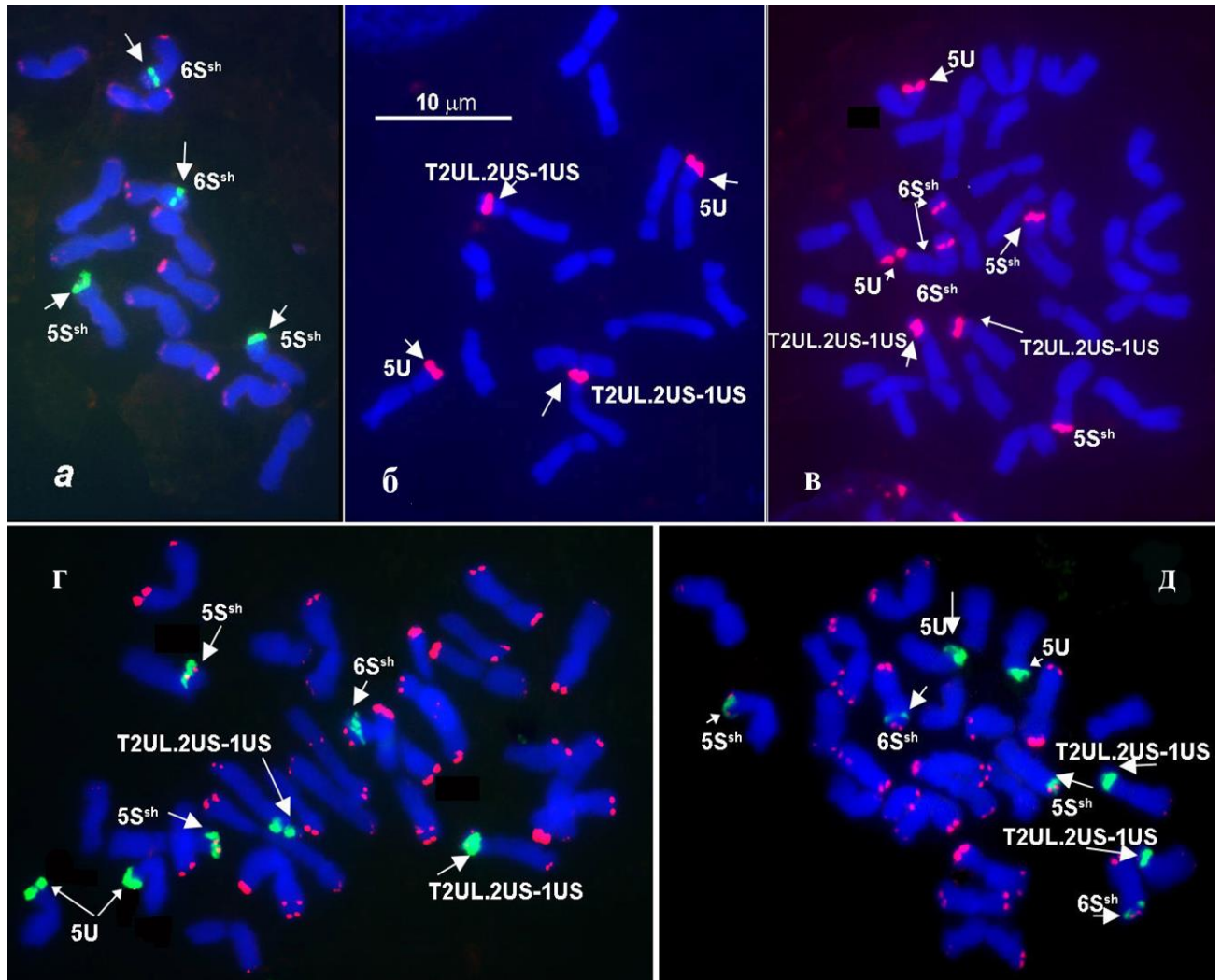


Рис. 31 FISH зонда *pTa 71* с метафазными хромосомами: (а) *Ae. sharonensis* (TH01), (б) *Ae.umbellulata* (TU04), (в) TH01xTU04 (S_2), (г) TH01 xTU04 (S_3) с одним $6S^{sh}$ локусом, и (д) TH01xTU04 (S_3) с двумя редуцированными $6S^{sh}$ локусами. В случаях а, г и д использовалась комбинация проб *pTa 71* (зеленый цвет) и *pSc119.2* (красный цвет); в случаях б и в- только *pTa 71* (красный цвет). NOR отмечены стрелками (Shcherban et al. 2008).

Анализ 3-х растений S_2 выявил 8 сайтов гибридизации во всех метафазных ядрах; наименьший сигнал наблюдался на хромосоме $6S^{sh}$, в то время как сигналы на хромосомах 1U:2U, 5U и $5S^{sh}$ были примерно одинаковые и гораздо крупнее сигнала на $6S^{sh}$ (Рис. 31в). Никакие

значительные изменения не были зафиксированы у растений S_2 по сравнению с диплоидными родителями. Однако, у 2-х растений поколения S_3 мы нашли делецию локуса 45S рДНК на одной из двух гомологичных $6S^{sh}$ хромосом (Рис. 31г). Это не было техническим артефактом, поскольку делеция была видна в 8 метафазных пластинках на одно растение S_3 . Некоторые растения по интенсивности сигнала были сходными с растениями S_2 , тогда как другие имели редуцированный сигнал на обоих гомологичных хромосомах $6S^{sh}$ (Рис. 31д; Табл. 9). В отличие от растений поколения S_2 , имеющих равные сигналы *pTa 71* в 5U и $5S^{sh}$, у всех растений S_3 и S_4 сигнал на хромосоме 5U был немного слабее, чем на хромосоме $5S^{sh}$.

Табл. 9 Число растений амфиплоида с различным сигналом *pTa71* на хромосоме $6S^{sh}$

Поколение	Число растений	Число растений с различным сигналом		
		сигнал только на одном гомологе	редуцированный на обоих гомологах	нередуцированный
S_2	3	0	0	3
S_3	13	2	7	4
S_4	8	0	6	2

3.3.2.2. Анализ структуры 45S рДНК

Последовательности 45S рДНК *Ae. umbellulata* и *Ae.sharonensis* были взяты из базы данных GenBank (X66111 и AJ315045, соответственно) Эти последовательности включают внешний транскрибируемый спейсер (external transcribed spacer; ETS) от сайта инициации транскрипции для РНК-полимеразы I (TIS) до 5'-конца 18S рРНК гена. Повторяющаяся рДНК единица *Ae. umbellulata* содержит вставку 130 пн после TIS, которая отсутствует у *Ae.sharonensis* (Рис. 32).

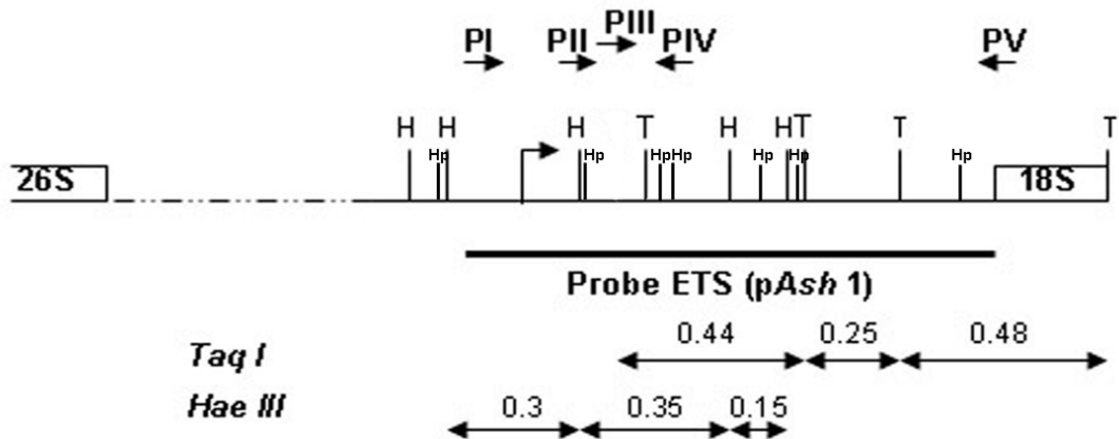
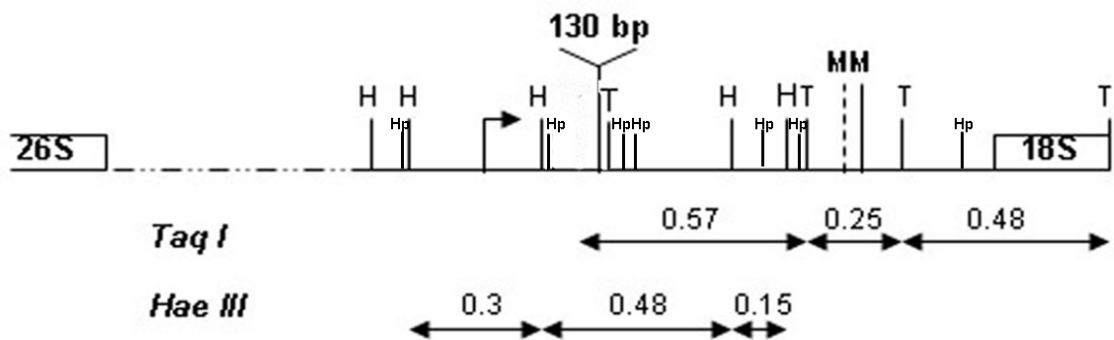
Ae. sharonensis*Ae. umbellulata*

Рис. 32 Схема повторяющихся единиц 45S рДНК *Ae. sharonensis* и *Ae. umbellulata* (ETS район). Позиции специфических праймеров (PI-PV) показаны сверху. Обозначены локализация рAsh1 зонда и длины фрагментов рестрикции. Сайты разрезания эндонуклеазами: H- *Hae*III; T- *Taq*I; M- *Msp*AI1; Hp- *Hpa* II/*Msp* I. Сайт инициации транскрипции (TIS) показан изогнутой стрелкой (Shcherban et al. 2008).

Для сравнения последовательностей 45S рДНК амфиплоида ТН01 x ТУ04 и диплоидных родителей нами были клонированы и секвенированы ПЦР-продукты, амплифицированные с помощью праймеров PI и PV (Рис. 32). Мы провели сравнение ранее изученных ETS- последовательностей из *Ae. umbellulata* (X66111) и *Ae. sharonensis* (AJ315045) с клонированными последовательностями из диплоидных родителей (рAsh1 и рAu1) и двумя последовательностями из амфиплоидного растения S₂ (рG/Ash2 и рG/Au2). Сравнение показало, что ETS- районы рДНК амфиплоида имеют высокую

степень гомологии с соответствующими районами родительских видов. Последовательность pG/Au2 имеет 99.4% гомологии с pAu1 *Ae. umbellulata* и 98.4% гомологии с последовательностью X66111 из базы данных. Последовательность pG/Ash2 полностью идентична pAsh1 *Ae.sharonensis*; уровень ее гомологии с AJ315045 из базы данных- 98.6%.

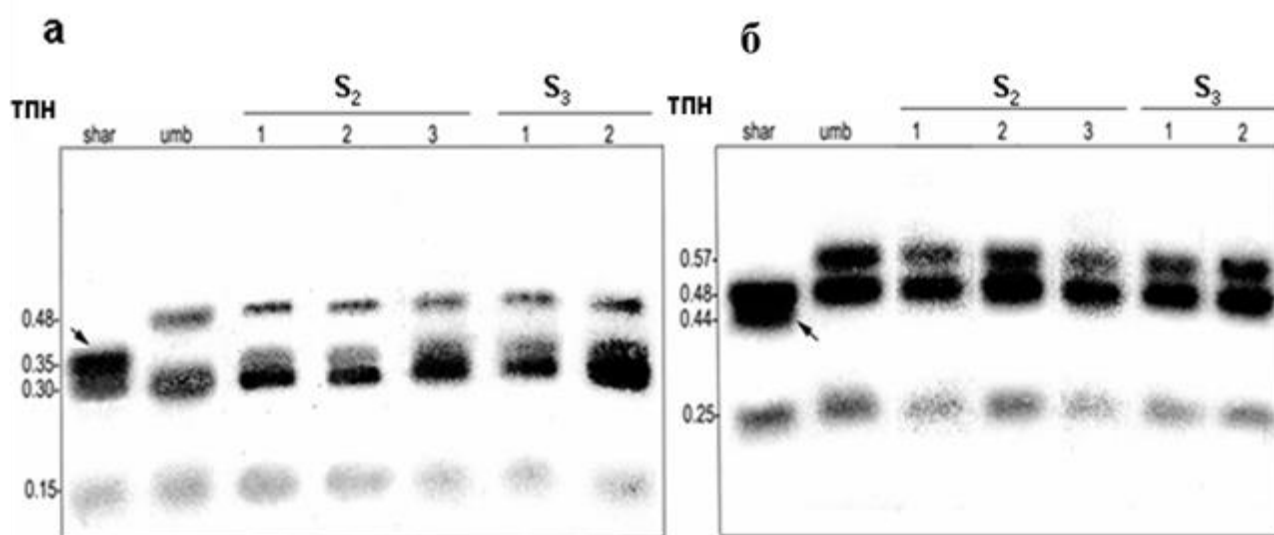


Рис. 33 Саузерн-гибридизация зонда pAsh1 с геномной ДНК амфиплоидных растений и диплоидных родителей. ДНК обрабатывалась *Hae*III (а) и *Taq*I (б). shar- *Ae.sharonensis* (ТН01), umb- *Ae. umbellulata* (ТУ04). Проанализированы индивидуальные растения S₂- поколения (1-3) и S₃-поколения (1-2). Стрелками обозначены фрагменты *Ae.sharonensis*, интенсивность которых уменьшается у амфиплоида (Shcherban et al. 2008).

Для анализа полиморфизма в составе ETS геномная ДНК растений S₂ и S₃ амфиплоида (3 и 2 растения соответственно), а также диплоидных родителей обрабатывалась различными эндонуклеазами рестрикции (*Hae*III, *Taq*I, *Hinf*I и *Sau*3A) с последующей Саузерн-гибридизацией с зондом pAsh1. В случае *Hae*III и *Taq*I были получены фрагменты 150-570 пн, соответствующие ожидаемым (Рис. 33). Фрагменты 480 пн (*Hae*III) и 570 пн (*Taq*I) являются специфичными для *Ae. umbellulata*, тогда как фрагменты 350 пн (*Hae*III) и 440 пн (*Taq*I) специфичны для *Ae. sharonensis*. На профиле *Hae*III-рестрикции амфиплоида выявлены фрагменты обоих родителей, однако, фрагмент 350 пн от *Ae. sharonensis* имел меньшую интенсивность по

сравнению с соответствующим родительским видом (Рис. 33а). Сходные результаты были получены с использованием эндонуклеаз рестрикции *Hinf* I и *Sau*3A. Редукция фрагмента специфичного для *Ae.sharonensis* была особенно заметна в случае *Taq*I- гидролиза с очень слабым фрагментом 440 пн, видимым только на оригинальной рентгеновской пленке (Рис. 33б). Никаких новых фрагментов гибридизации во всех случаях обнаружено не было. Редукция интенсивности у амфиплоида ТН01 х ТУ04 фрагментов гибридизации от *Ae. sharonensis* по всей вероятности связана с частичной потерей или дивергенцией 45S рДНК этого генома на ранних стадиях формирования амфиплоида.

Во всех известных ETS- последовательностях *Ae. umbellulata* имеются два близко расположенных сайта узнавания эндонуклеазой *Msp*AI1, которые отсутствуют в соответствующем районе *Ae. sharonensis* (Рис. 32). Это отличие между единицами рДНК двух геномов было использовано для дальнейшего изучения их наследования с помощью CAPS метода. На первом этапе была проведена ПЦР- амплификация районов ETS рДНК с использованием праймеров РIII и РV, фланкирующих инсерцию 130 пн, характерную только для *Ae. umbellulata* (Рис. 32). ПЦР- продукт далее был обработан эндонуклеазой *Msp*AI1. На электрофореграмме разделения обработанных продуктов ПЦР видны следующие фрагменты (Рис. 34): единственный фрагмент 920 пн у *Ae. sharonensis*, два интенсивных фрагмента 670 и 320 пн и слабый фрагмент длиной 730 пн - у *Ae. umbellulata*. Наличие слабого фрагмента (730 п.н.) можно объяснить полиморфизмом рДНК *Ae. umbellulata* по числу сайтов узнавания *Msp*AI1 –небольшая часть единиц рДНК этого вида, вероятно, имеет только один сайт *Msp*AI1. Наряду с фрагментами, наследуемыми от обоих диплоидных родителей, спектр исследуемого амфиплоида содержит один дополнительный минорный фрагмент 540 пн. Сходные результаты были получены с использованием праймеров РII и РV (данные не представлены). Поскольку смесь геномной ДНК родительских видов не продуцирует этот фрагмент, мы предположили,

что в ходе формирования амфиплоида произошла дивергенция первичной структуры в составе ETS у части единиц 45S рДНК.

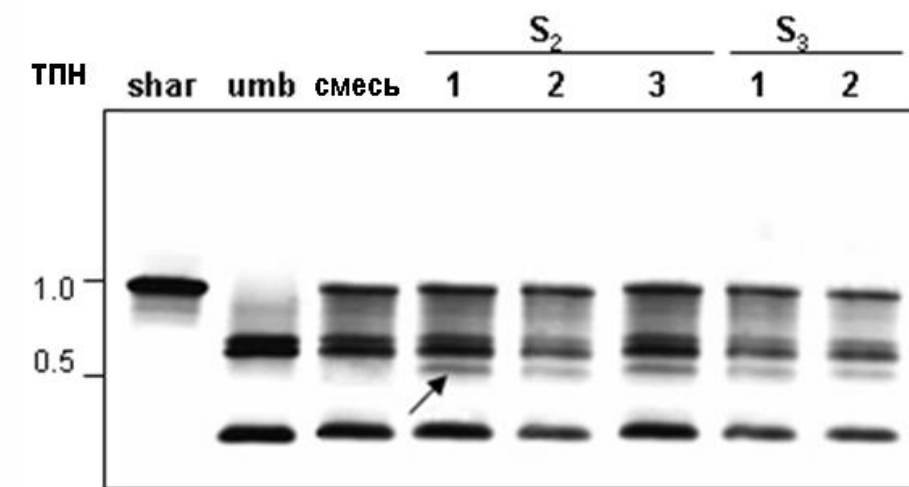


Рис. 34 CAPS- анализ. Геномная ДНК подвергалась ПЦР с праймерами PIII и PV и обрабатывалась *Msp*AI1 эндонуклеазой. Стрелкой обозначен новый фрагмент у амфиплоидных растений. Смесь ДНК родительских видов в соотношении 1:1. Остальные обозначения как на рис. 33 (Shcherban et al. 2008).

3.3.2.3. Анализ метилирования 45S рДНК

Для анализа возможных изменений спектра метилирования рДНК мы обрабатывали ДНК амфиплоида ТН01 x ТУ04 и его родителей парой эндонуклеаз рестрикции *Hpa* II и *Msp* I, которые являются изошизомерами, то есть имеют различную чувствительность к метилированию цитозина в сайте узнавания. *Msp*I не чувствительна к метилированию внутреннего цитозина, но не способна разрезать ДНК в том случае, когда метилирован внешний цитозин (mCCGG). В случае *Hpa*II наблюдается обратная ситуация.

Для обнаружения полиморфизма сайтов метилирования внутри ETS мы вначале обрабатывали геномную ДНК *Hpa*II и *Msp*I, затем проводили ПЦР с праймерами PII и PIV, которые дают различающиеся ПЦР-продукты у родительских видов (Рис. 32). Район- мишень находится вблизи TIS и содержит 3 сайта *Hpa* II / *Msp* I. В случае рестрикции по этим сайтам ПЦР-продукт не должен амплифицироваться. ПЦР с использованием не-обработанной геномной ДНК (контроль) продуцировала ярко-выраженные

фрагменты от обоих родителей у всех исследованных амфиплоидных растений S_2 и S_3 (Рис. 35а). В отличие от этой картины, ДНК амфиплоидных растений, обработанная *MspI*, давала ПЦР-продукт от *Ae. umbellulata*, значительно более слабой интенсивности по сравнению с продуктом *Ae. sharonensis* (Рис. 35б). Сходная картина была получена в результате ПЦР-амплификации *HpaII*- обработанной геномной ДНК (Рис. 35в). Эти результаты позволяют предположить относительно большую степень метилирования повторяющихся единиц 45S рДНК *Ae. sharonensis*, вероятно связанную с супрессией NOR этого генома в ходе аллополиплоидизации.

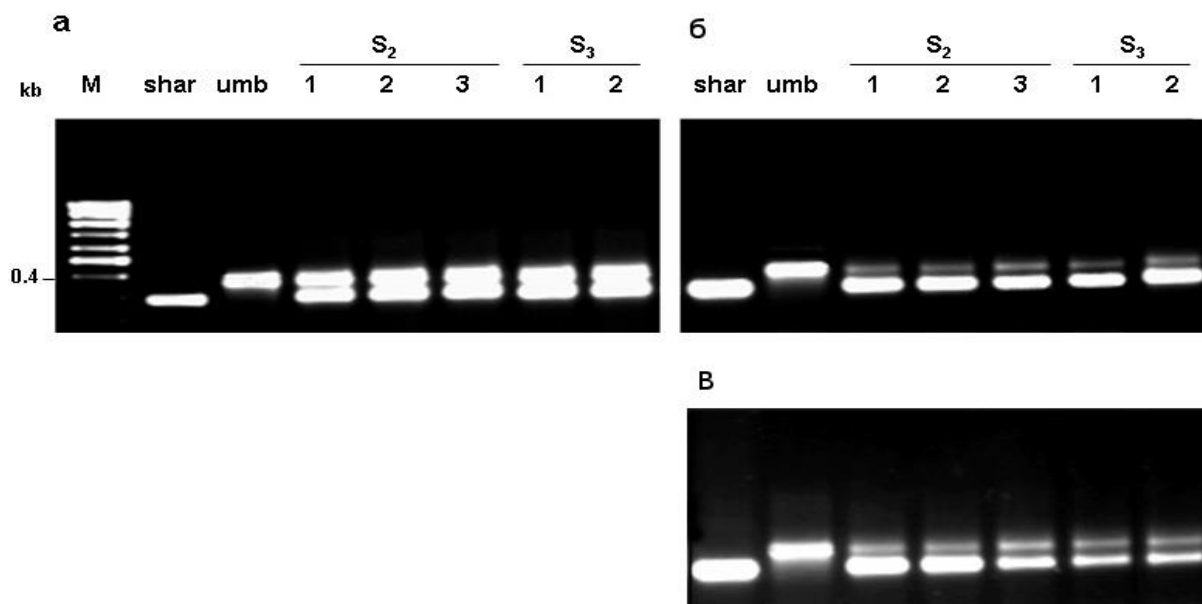


Рис. 35 ПЦР- анализ геномной ДНК, обработанной *HpaII/MspI* эндонуклеазами рестрикции. (а) ПЦР с необработанной ДНК (контроль), (б) ПЦР с *MspI*- обработанной ДНК, (в) ПЦР с *HpaII*- обработанной ДНК. В качестве маркера длины использована «лестница 100 пн». Обозначения как на рис. 33 (Shcherban et al. 2008)

3.3.3. Анализ изменений 5S рДНК у синтетических амфиплоидов

Как и гены 45S рРНК, гены 5S рРНК организованы в тандемные ряды, каждый из которых содержит от нескольких сотен до нескольких тысяч генов. Геномная организация 5S рДНК детально изучена у многих представителей Triticeae, включая как диплоидные, так и полиплоидные виды (Appels et al., 1980; Scoles et al., 1988; Вахитов и др., 1989; Dvorak et al 1989; Kellogg and Appels, 1995; Baum et al., 1998; Baum et al., 2004). В то же время,

поведение этого класса рДНК на ранних стадиях эволюции аллополиплоидов менее изучено по сравнению с ядрышкообразующими генами, кодирующими 45S рРНК. Целью нашей работы являлся анализ изменений кластеров 5S рДНК на ранних стадиях аллополиплоидизации с использованием в качестве модели трех синтетических гибридов *Triticum* x *Aegilops* разного геномного состава и уровня ploидности (табл. 3).

3.3.3.1. Анализ локализации генов 5S рРНК

Анализ локализации генов 5S рРНК проводили с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* рекомбинантной плазмиды рTa794, содержащей BamHI-последовательность повторяющейся единицы 5S рДНК (Рис. 36).

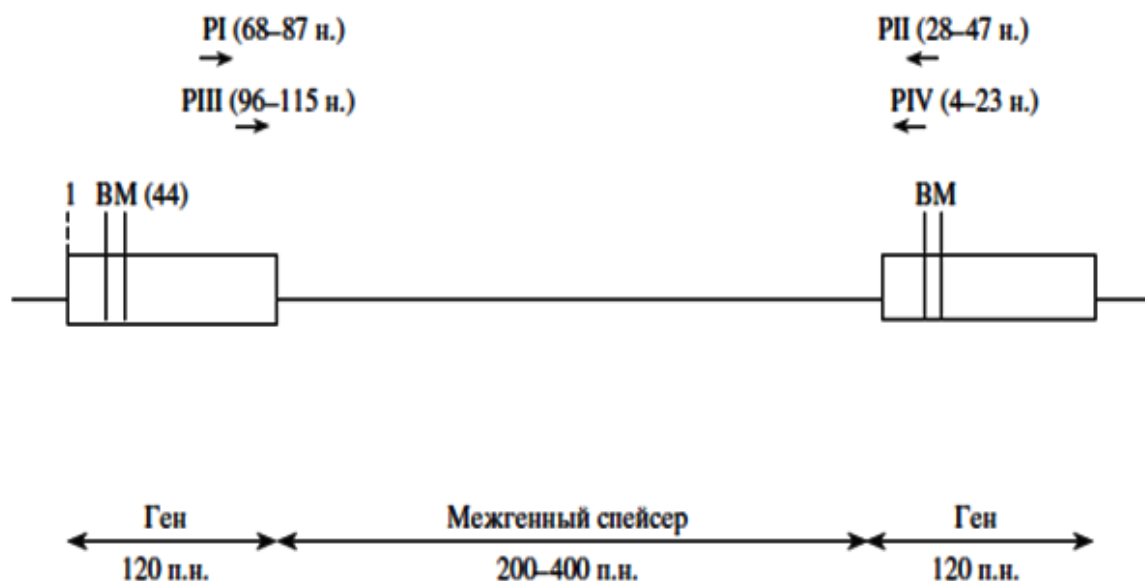


Рис. 36 Схема повторяющейся единицы 5S рДНК пшеницы. М, В - сайты гидролиза *Msp*I (в скобках указана позиция первого нуклеотида) и *Bam*HI, соответственно. Стрелками обозначены специфические праймеры для ПЦР (Щербань и др. 2008).

У трех синтетических амфиплоидов выявлены следующие особенности геномной организации 5S рДНК (Рис. 37).

1) У амфиплоида ТМУ38хТQ27 (Рис. 37г) в сравнении с родительскими видами (Рис. 37б, е) обнаружено уменьшение сигнала на хромосоме 1D *Ae*.

tauschii, в то время как остальные локусы не показывали существенных изменений. Наиболее интенсивный сигнал выявлен на 1А-хромосоме *T. urartu*; локусы на хромосомах 5D и 5А имели примерно одинаковую интенсивность (Рис. 37г).

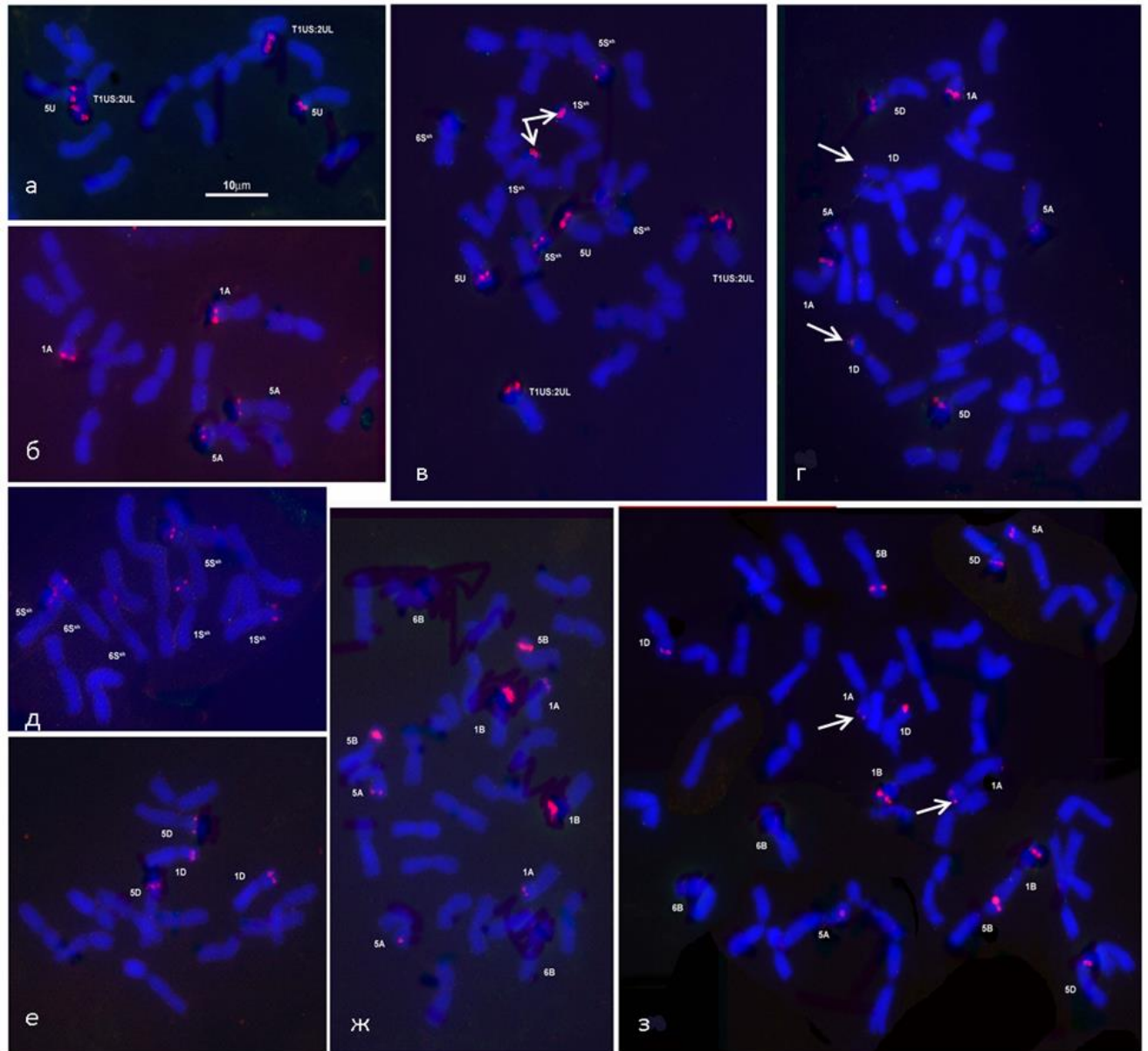


Рис. 37 FISH зонда pTa794 с митотическими метафазными хромосомами амфиплоидов и соответствующих родительских видов: а - *Ae. umbellulata* TU04; б - *T. urartu* TMU38; в - амфиплоид TU04 x TH01; г - амфиплоид TMU38 x TQ27; д - *Ae. sharonensis* TH01; е - *Ae. tauschii* TQ27; ж - *T. dicoccoides* TTD20; з - амфиплоид TTD20 x TQ27. Кариотип *Ae. umbellulata* TU04 содержит транслокацию T1US : 2UL (Badaeva et al., 2004). Стрелками обозначены сайты в составе амфиплоидов, отличающиеся по интенсивности от соответствующих сайтов родительских видов (Щербань и др. 2008).

2) В отличие от предыдущего гибрида, у амфиплоида TTD20 x TQ27 (Рис. 37з) не выявлено никаких изменений в интенсивности локусов 5S рДНК на хромосомах D-генома. Однако было обнаружено уменьшение сигнала на хромосоме 1A. У родительского тетраплоидного вида *T. dicoccoides* (Рис. 37ж) указанная хромосома имела выраженный гибридационный сигнал на всех анализированных метафазных пластинках, тогда как у амфиплоида этот сигнал был всегда слабее.

3) Локус 5S рДНК на хромосоме 1S^{sh} в составе амфиплоида TU04 x TH01 (Рис. 37в) имел больший размер, чем на соответствующей хромосоме родительского вида *Ae. sharonensis* (Рис. 37д). В то же время, хромосомы U-генома не проявляли выраженных изменений относительно диплоидного вида *Ae. umbellulata* (Рис. 37а).

Таким образом, эти результаты показывают, что на начальных этапах формирования аллополиплоидного генома сохраняется число и хромосомная локализация локусов 5S рДНК, однако, наряду с этим происходят количественные изменения, затрагивающие локусы, расположенные на хромосомах первой гомеологичной группы.

3.3.3.2. Анализ структурной организации генов 5S рРНК

Геномную ДНК, выделенную из синтетических амфиплоидов и их родителей, обрабатывали эндонуклеазой *MspI*, имеющей уникальный сайт узнавания в составе тандемно организованной повторяющейся единицы (мономера) 5S рДНК злаков (Рис. 36).

На Рис. 38 представлен результат гибридизации зонда *pTa794* с геномной ДНК, обработанной *MspI*. Этот фермент выявляет периодическую серию фрагментов гидролиза, характерную для тандемно организованных последовательностей ДНК. Спектры фрагментов гидролиза *MspI* амфиплоидов TU04 x TH01 и TTD20 x TQ27 не отличаются от спектров их родителей и состоят из двух взаимно-перекрывающихся серий фрагментов, соответствующих основным субсемействам 5S рРНК генов с длиной

мономеров ~ 0.4 и 0.5 тпн. (Рис. 38а,в). У амфиплоида TMU38 x TQ27 (Рис. 38б), в отличие от двух предыдущих, спектры родительских видов отличаются друг от друга, а именно: спектр *T. urartu* составляет только одна ярко-выраженная серия фрагментов с мономером длиной ~ 0.3 тпн, тогда как спектр *Ae. tauschii* соответствует другим видам. Спектр TMU38 x TQ27 более близок к спектру родительского вида *T. urartu* из-за того, что фрагменты от *Ae. tauschii* имеют более слабую интенсивность по сравнению с фрагментами от *T. urartu* (рис. 38б). Эта особенность характерна для двух проанализированных растений S_2 - и S_3 -поколений данного амфиплоида.

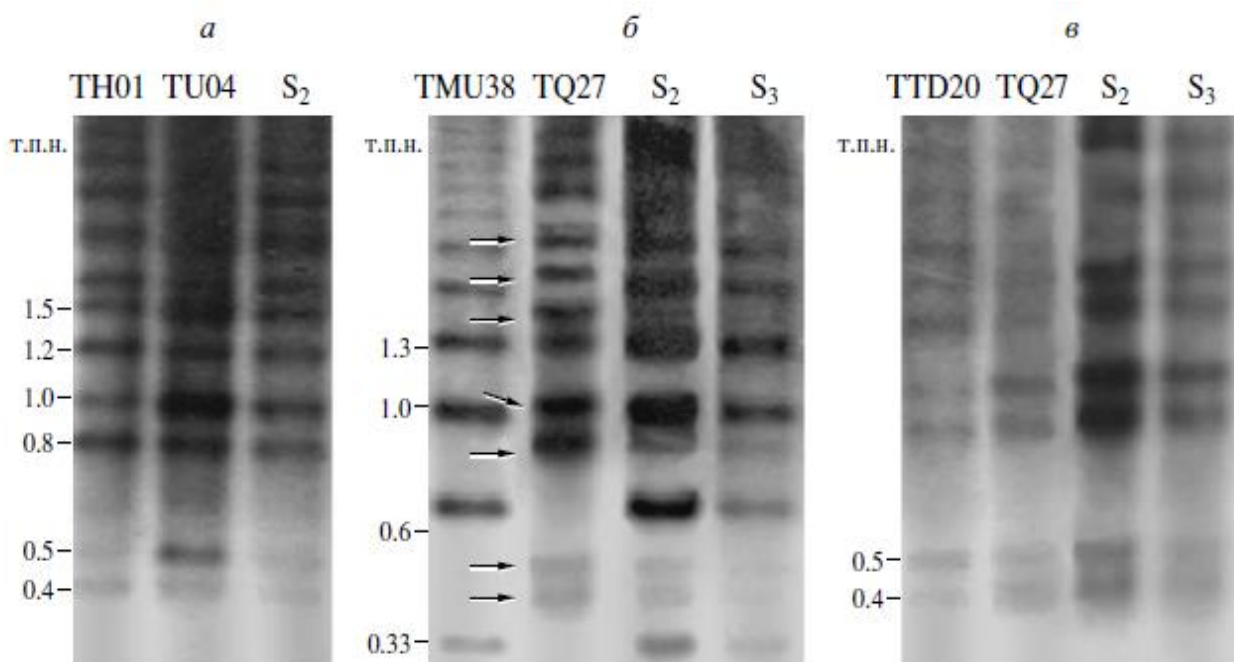


Рис. 38 Саузерн-гибридизация зонда рTa794 с геномной ДНК синтетических амфиплоидов и их родителей, обработанной рестриктазой *Msp*I. Обозначения образцов: TH01 - *Ae. sharonensis* TH01; TU04 - *Ae. umbellulata* TU04; TTD20 - *T. dicoccoides* TTD20; TMU38 - *T. urartu* TMU38; TQ27 - *Ae. tauschii* TQ27. а - TU04 x TH01 (S_2); б - TMU38 x TQ27 (S_2 , S_3); в - TTD20 x TQ27 (S_2 , S_3). Стрелками обозначены фрагменты *Ae. tauschii* TQ27, показывающие уменьшение интенсивности у гибрида TMU38 x TQ27 (Щербань и др. 2008).

Для дальнейшего анализа полиморфизма 5S рДНК в составе синтетических амфиплоидов мы использовали метод ПЦР. С этой целью были сконструированы специфические праймеры, позволяющие

амплифицировать нетранскрибируемый спейсерный район (Рис. 36). Как известно, последовательности 5S рДНК, входящие в состав различных хромосомных локусов, отличаются по длине и структуре этого района (Appels et al., 1980; Dvorak et al., 1989; Baum et al., 2004). Наряду с растениями, проанализированными на предыдущем этапе, для ПЦР-анализа дополнительно отобраны несколько растений S_2 - и S_3 -поколений амфиплоидов. В случае амфиплоида TMU38 x TQ27 анализировали наибольшее число растений, так как Саузерн-гибридизация выявила в нем количественные изменения, а также различия в спектрах родительских видов (Рис. 38б). Помимо ДНК родителей в последнем случае в качестве контроля использовали смесь ДНК родительских видов в соотношении 1 : 1 (mix). ПЦР-анализ с помощью праймеров PI/PII не выявил каких-либо существенных изменений ПЦР-спектров у изученных аллополиплоидов относительно соответствующих родителей (Рис. 39). Спектры аллополиплоида TMU38 x TQ27 состояли из фрагментов обоих родительских видов, соответствующих по интенсивности аналогичным фрагментам mix-образца (Рис. 39в). Следует отметить, что сходный результат был получен с использованием и другой комбинации праймеров- PIII/PIV (данные не представлены).

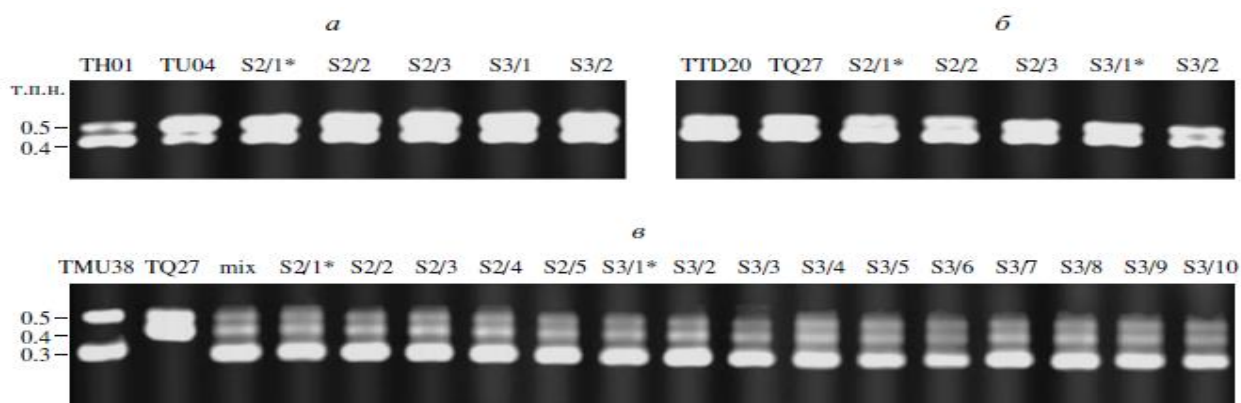


Рис. 39 ПЦР со специфическими праймерами (PI/PII) к 5S рДНК. Обозначения образцов родительских видов те же, что и на Рис. 39. а - TU04 x TH01; б - TTD20 x TQ27; в - TMU38 x TQ27; SN/n - гибридные растения (где N - номер поколения, n - индивидуальное растение из этого поколения); mix - смесь ДНК родительских видов TMU38 и TQ27. Звездочками обозначены растения, использованные для Саузерн-гибридизации (см. Рис. 38) (Щербань и др. 2008).

На следующем этапе мы провели клонирование ПЦР-продуктов амфиплоида TMU38 x TQ27 и его родителей с последующим анализом первичной структуры клонированных последовательностей ДНК. Проанализировано 14 последовательностей 5S рДНК, включая: 9 последовательностей из генома амфиплоида, 4 - из родительского генома *T. urartu* и одна - из генома *Ae. tauschii*. Из первых девяти, восемь последовательностей имели длину 307 пн (характерна для *T. urartu*) и одна - 470 пн. В сравнительный анализ были включены также известные последовательности 5S рДНК видов *T. urartu* и *Ae. tauschii* из баз данных (Scoles et al., 1988; Вахитов и др., 1989). Последовательности длиной 307 пн, выделенные из генома амфиплоида, имели высокую степень сходства (98-100%) с соответствующими последовательностями из родительского генома *T. urartu*, а также ранее проанализированными последовательностями этого вида. Последовательность амфиплоида длиной 470 пн имела 98% сходства с соответствующей последовательностью из родительского генома *Ae. tauschii* и с последовательностями этого вида из баз данных. Таким образом, анализ первичной структуры выявил высокую гомологию спейсерных последовательностей 5S рДНК из генома амфиплоида TMU38 x TQ27 с аналогичными последовательностями из родительских видов.

Заключение к главе 3.3. В качестве объекта для изучения ранних геномных изменений в ходе аллополиплоидизации был использован уникальный материал синтетических амфиплоидов между различными видами *Triticum* и *Aegilops*. С целью выявления возможных изменений в различных фракциях геномной ДНК (макро- и микросателлитные- SSR повторы, случайно амплифицируемые последовательности ДНК) на первом этапе был использован метод ПЦР. В качестве объекта для анализа был взят амфиплоид *Ae. longissima* x *T. urartu* (TL05 x TMU06; $2n=28$). Однако, использование различных методических приемов, таких как комбинирование праймеров к различным субтеломерным повторам, RAPD и SSR- анализы не

позволило выявить существенные реорганизации геномной ДНК. Не было зафиксировано появление новых продуктов ПЦР по сравнению с родительскими видами, а выявленные факты исчезновения продуктов одного из родителей в случае последовательностей RAPD обусловлены, по-видимому, точечными мутациями в сайтах отжига праймеров. Выявленный единственный случай полиморфизма в составе макросателлитных повторов (исчезновение продукта Tel-Sp52R-500 у амфиплоида) не связан с данными повторами, а обусловлен делецией, или мутацией последовательности, предположительно относящейся к мультигенному семейству SEUSS-подобных транскрипционных факторов.

На втором этапе нами был проведен анализ организации умеренно-повторяющихся последовательностей, кодирующих рибосомальную 45S и 5S рНК. Первоначально, с помощью метода окрашивания хромосом серебром было установлено ядрышковое доминирование генов 45S рНК *Ae. umbellulata* у амфиплоида *Ae. umbellulata* x *Ae. sharonensis* (TU04 x TH01). Впервые установлена связь между замолканием (супрессией) генов 45S рНК и их делецией в составе отдельных хромосомных локусов на ранних стадиях аллополиплоидизации. У растений поколения S_3 была обнаружена делеция локуса 45S рНК на одной из гомологичных $6S^{sh}$ хромосом *Ae. sharonensis*. Наряду с этим, у части растений S_3 и S_4 выявлено уменьшение размера NOR- локуса на обоих $6S^{sh}$ хромосомах. Все проанализированные гибридные растения демонстрировали аддитивный паттерн Саузерн-гибридизации, включающий фрагменты обоих родителей, однако, интенсивность фрагментов от *Ae. sharonensis* была существенно снижена, по сравнению с родительским видом. Также в составе амфиплоида нами был идентифицирован новый амплифицированный вариант повторяющейся единицы 45S рДНК *Ae. umbellulata*. Аналогичным образом, на примере 3-х синтетических амфиплоидов исследовали изменения 5S рДНК на ранней стадии аллополиплоидизации. С помощью FISH у растений поколения S_3 каждой гибридной комбинации обнаружены количественные

изменения, затрагивающие отдельные локусы одного из родительских геномов. Саузерн-гибридизация с геномной ДНК амфиплоида *T. urartu* x *Ae. tauschii* (TMU38 x TQ27) выявила более низкую интенсивность фрагментов от *Ae. tauschii* по сравнению с фрагментами от *T. urartu*, что может служить подтверждением редукции сигнала на хромосоме 1D, обнаруженной у этого гибрида с помощью FISH. Появление новых фрагментов 5S рДНК или полное исчезновение фрагментов родительских видов у изученных амфиплоидов не обнаружено ни в результате Саузерн-гибридизации, ни ПЦР-анализа растений S₂-S₃ поколений. Изменения не обнаружены при сравнении первичной структуры девяти последовательностей 5S рДНК амфиплоида TMU38xTQ27 с аналогичными последовательностями из геномов родительских видов. Таким образом, нами впервые показано, что уже на ранних стадиях аллополиплоидизации происходит конкурентное ингибирование экспрессии конститутивных умеренно-повторяющихся генов рРНК одного из родительских геномов, которое сопровождается процессом элиминации супрессированных генов.

3.4. Структурно-функциональная дивергенция гомеологичных генов *VRN-1* в ходе формирования геномов полиплоидных пшениц

Система генов яровизации (*VRN-1*) определяет широкий адаптивный потенциал полиплоидных форм пшениц в определении оптимального срока колошения в тех или иных климатических условиях. Характер взаимодействия аллелей гомеологичных локусов, определяющий их совместный фенотипический эффект является следствием коэволюции и коадаптации регуляторных систем генов-гомеологов в составе аллополиплоидного генома. Наша задача заключалась в выяснении структурно-функциональных особенностей гомеологичных генов *VRN-1* мягкой пшеницы и изучении процесса формирования этих особенностей в ходе возникновения и эволюции полиплоидных пшениц.

Проведенный ранее анализ первичной структуры различных аллелей генов *VRN-1* показал наличие в них вариабельных регуляторных районов, которые могут определять уровень экспрессии этих генов, в зависимости от внешних и внутренних факторов (температуры, фотопериода, уровня гормонов и тд) (Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005; Iqbal et al 2007; Santra et al. 2009; Golovnina et al. 2010). Однако, поскольку генотип имеет огромное влияние на фенотипическое проявление указанных аллелей (срок колошения), постольку в большинстве ранних работ нет четкой ассоциации между присутствием специфических аллелей *VRN-1* и их проявлением на уровне фенотипа. Для выявления такой ассоциации требуются генетические модели, в которых различные аллели одного гена находятся на одинаковом генетическом фоне (изогенные линии).

3.4.1. Анализ первичной структуры и экспрессии различных аллелей *VRN-B1* в составе изогенных линий мягкой пшеницы, отличающихся по времени колошения

Ранее было установлено наличие различных аллелей *VRN-B1* (*VRN-B1^S* и *VRN-B1^{Dm}*) в сортах мягкой пшеницы «Саратовская 29» и «Диамант 2», соответственно, и зафиксированы незначительные отличия между этими сортами по времени колошения (Майстренко, 1992). Для дальнейшего анализа влияния различных аллелей *VRN-B1* на время колошения были получены изогенные линии iBz/S29 and iBz/Dm на основе озимого сорта «Безостая 1». Было обнаружено, что время колошения линии iBz/S29 на 10-14 дней опережает время колошения линии iBz/Dm (Efremova et al., 2011). В настоящей работе был проведен детальный анализ первичной структуры обеих *VRN-B1* аллелей, выделенных из состава вышеуказанных изогенных линий.

3.4.1.1. Анализ первичной структуры аллелей *VRN-B1*

Полные нуклеотидные последовательности аллелей *VRN-B1^S* и *VRN-B1^{Dm}* помещены в Genbank под номерами HQ130482 и HQ130483, соответственно.

Общая длина $VRN-B1^{Dm}$ и $VRN-B1^S$ аллелей составляет 6 488 и 6 101 пн, соответственно. Кодрующие последовательности обоих аллелей (727 пн) включают 8 экзонов и полностью идентичны друг другу. Также идентичны промоторные районы (на протяжении 968 пн от старта транскрипции) и интроны 2-7. За исключением одной нуклеотидной замены внутри интрона 1 полная последовательность $VRN-B1^{Dm}$ аллеля была идентична ранее изученной последовательности аллеля $VRN-B1a$ из изогенной линии Triple Dirk В *T. aestivum* (AY747603). Аллель $VRN-B1^S$, благодаря наличию уникальных структурных особенностей в составе интрона 1: делеции 0.8 тпн и дупликации 0.4 тпн (Рис. 40) был обозначен нами как $VRN-B1c$, чтобы подчеркнуть его отличие от ранее описанных аллелей $VRN-B1a$ (Fu et al., 2005) и $VRN-B1b$ (Santra et al., 2009). Таким образом, все выявленные структурные отличия между аллелями $VRN-B1$ находятся в составе 1-го интрона.

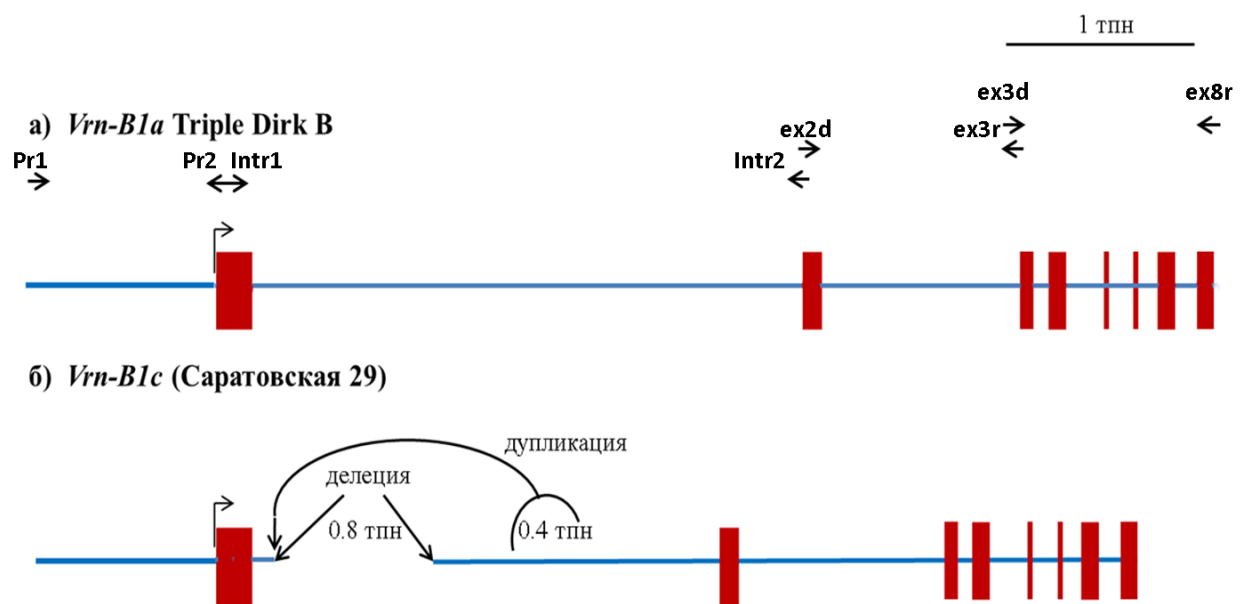


Рис. 40 Структура аллелей $VRN-B1$: а) $VRN-B1a$ TDB (AY747603); б) $VRN-B1c$. Стрелки над схемой показывают позиции специфических праймеров, использованных для выделения отдельных участков и анализа их первичной структуры. Сайт инициации транскрипции обозначен стрелкой. Экзоны отмечены вертикальными красными прямоугольниками. Показаны структурные отличия между аллелями (Shcherban et al. 2013).

3.4.1.2. Анализ уровня транскрипции *VRN-B1* в изогенных линиях

Для исследования уровней транскрипции *VRN-B1*, определяющих различные сроки колошения у изогенных линий, нами проведена ОТ-ПЦР с образцами РНК из листьев неярвизированных растений на различных стадиях до колошения (см. «Материалы и методы»). У озимого сорта «Безостая 1», служащего в качестве рекуррентного родителя при получении изогенных линий, транскрипция *VRN-B1* не наблюдалась на стадиях 3-5 листа (Рис. 41). В яровых линиях, несущих доминантные *VRN-A1*, *VRN-B1a* или *VRN-B1c* аллели, уровень транскрипции этих аллелей возрастал, достигая максимального значения к стадии 5-го листа. При этом, аллель *Vrn-A1* имел самый высокий уровень транскрипции, тогда как уровень *Vrn-B1a* был самым низким. Транскрипционная активность аллелей *Vrn-A1*>*Vrn-B1c*>*Vrn-B1a* коррелировала с порядком выколашивания соответствующих линий: *i:Bz1Vrn-A1*, *i:Bz1Vrn-B1c* и *i:Bz1Vrn-B1a*. Наблюдалось заметное различие между 2-мя линиями с аллелями *VRN-B1*, причем максимальная транскрипция *VRN-B1* в линии *i:Bz1Vrn-B1a* была сопоставима с минимальным уровнем у *i:Bz1Vrn-B1c* (Рис. 41).

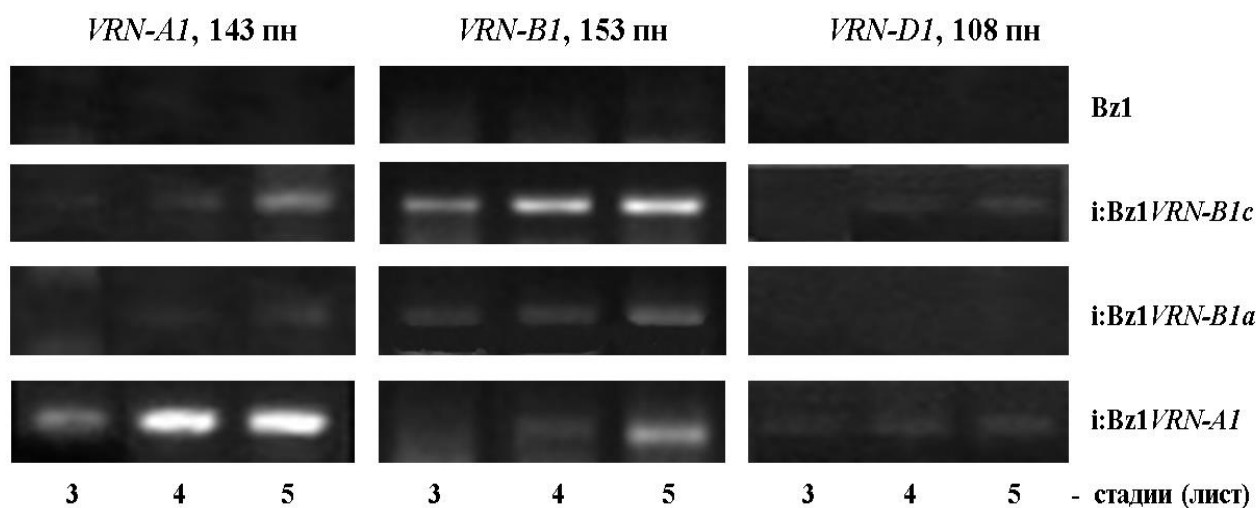


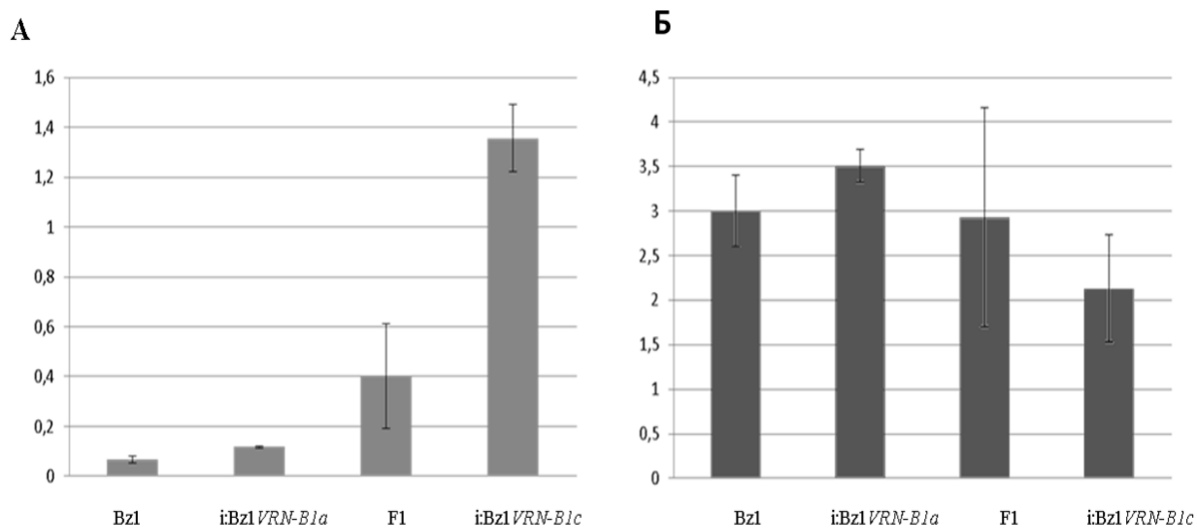
Рис. 41 Транскрипция *VRN-1* гомеоаллелей в линиях *i:Bz1VRN-A1*, *i:Bz1VRN-B1c* и *i:Bz1VRN-B1a*. Продукты RT-PCR были амплифицированы с помощью специфических для каждого гомеоаллеля праймеров. Длина ПЦР-продуктов указана сверху в пн (Shcherban et al. 2013).

В присутствии доминантных аллелей *VRN-B1* происходила индукция транскрипции рецессивных аллелей гомеологических локусов. В линии *i:Bz1Vrn-A1* транскрипты с рецессивных *vrn-B1* и *vrn-D1* генов обнаруживались, начиная со стадии 3-го листа, при этом *vrn-B1* транскрибировался более интенсивно, по сравнению с *vrn-D1*. В линии *i:Bz1Vrn-B1a* транскрипты с рецессивного *vrn-A1* появлялись, начиная с 4-го листа, тогда как *vrn-D1*- транскрипты не выявлялись ни на одной из изученных стадий. У линии *i:Bz1Vrn-B1c* транскрипты с аллелей *vrn-A1* и *vrn-D1* обнаруживались, начиная со стадий 3-го и 4-го листа, соответственно. В целом, в присутствии одного доминантного аллеля *VRN-1* уровни транскрипции рецессивных аллелей генов- гомеологов соотносились следующим образом: *vrn-A1*>*vrn-B1*>*vrn-D1*. По индуцирующему эффекту на рецессивные гомеоаллели доминантные аллели *VRN-1* могут быть распределены в соответствии с их собственной транскрипционной активностью: *Vrn-A1*>*Vrn-B1c*>*Vrn-B1a*.

Для более точной оценки транскрипционных уровней *VRN-1* в соответствующих изогенных линиях, была проведена количественная ОТ-ПЦР на стадии 3-го листа. Были использованы образцы кДНК изогенных линий *i:Bz1VRN-B1a*, *i:Bz1VRN-B1c*, а также F₁ гибридных растений между этими линиями и сорта «Безостая 1» в качестве контроля. Статистически значимое различие ($t = 9.2$, $P > 0.95$) по уровню транскрипции *VRN-B1* было зафиксировано между двумя линиями: количество *VRN-B1* транскриптов у *i:Bz1VRN-B1c* примерно в 10 раз превышало таковое у *i:Bz1VRN-B1a* (Рис. 42). Средний уровень транскрипции *VRN-B1* у гетерозиготных F₁ растений был более сходным с соответствующим уровнем у линии *i:Bz1VRN-B1a*.

Мы также провели количественную оценку уровня транскрипции *VRN-2* гена, предполагаемого репрессора цветения. Уровень транскрипции *VRN-2* в линии *i:Bz1VRN-B1c* был в 1.6 раза ниже, чем в линии *i:Bz1VRN-B1a*, что предполагает наличие негативной корреляции между уровнями транскрипции *VRN-1* и *VRN-2* в изученных линиях. Однако, указанное

различие между линиями не было статистически достоверным (Рис. 42). Негативная корреляция между уровнями транскрипции *VRN-1* и *VRN-2* предполагает вероятную супрессию *VRN-2* продуктом *VRN-1*.



В

Генотипы	Bz1		i:Bz1VRN-B1a		F1	
	<i>VRN-B1</i>	<i>VRN-2</i>	<i>VRN-B1</i>	<i>VRN-2</i>	<i>VRN-B1</i>	<i>VRN-2</i>
i:Bz1VRN-B1a	4.00/0.057	1.27/0.329				
F1	1.63/0.243	0.01/0.986	1.38/0.299	0.46/0.686		
i:Bz1VRN-B1c	<u>9.55/0.010</u>	2.22/0.155	<u>9.20/0.011</u>	2.22/0.155	3.86/0.060	0.58/0.615

Рис. 42 Количественный RT-PCR- анализ *VRN-B1* (А) и *VRN-2* (Б) транскрипции в изогенных линиях i:Bz1VRN-B1a, i:Bz1VRN-B1c и их F₁ гибриде на стадии 3-го листа. В- Т/р значения *VRN-B1* и *VRN-2* экспрессии в различных изученных генотипах. Наиболее значимые различия между генотипами подчеркнуты (Shcherban et al. 2013).

3.4.2. Анализ аллельного разнообразия генов *VRN-1* и *PPD-D1* в различных сортах мягкой пшеницы; ассоциация *VRN-1* генотипа со сроком колошения

Чувствительность к яровизации (яровой и озимый типы) и срок колошения у полиплоидных пшениц контролируются комбинацией аллелей гомеологичных локусов *VRN-1*. Наряду с геном *VRN-1*, большое влияние на срок колошения оказывает ген *PPD-D1*, - основной ген, контролирующей чувствительность к фотопериоду (Beales et al. 2007). Нами был проведен

анализ аллельного полиморфизма генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-D1* в большой выборке яровых сортов мягкой пшеницы из различных географических районов Европы и России (с прилегающими территориями Украины и Казахстана). У Европейских сортов проведена оценка срока колошения для поиска возможной ассоциации генотипа *VRN-1* со сроком колошения.

Проанализированные сорта представляли основные экогеографические районы Европы (245 сортов) и России (90 сортов) (Табл. 2 приложения). Скрининг генотипов осуществлялся с использованием ранее разработанных молекулярных маркеров для детекции доминантных и рецессивных аллелей *VRN-1* локусов: *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*, а также *PPD-D1* (Табл. 5).

Нами установлено, что 91% и 98.9% Европейских и Российских сортов, соответственно, содержат чувствительный к фотопериоду аллель *PPD-D1b*. Нечувствительный к фотопериоду аллель *PPD-D1a* был обнаружен, главным образом, в южных регионах Европы (32% сортов). Эти регионы характеризуются преимущественно моногенным контролем чувствительности к яровизации с участием доминантных аллелей *VRN-B1a* или *VRN-D1a*, тогда как в оставшейся части Европы, а также в России комбинация фотопериод-чувствительного аллеля *PPD-D1b* с двумя доминантными аллелями *VRN-A1a*, *VRN-B1a* и рецессивным *vrn-D1* является наиболее распространенной (Рис. 43).

В России аллель *VRN-B1a* незначительно преобладал над *VRN-B1c* (48.8% и 44.4%, соответственно), тогда как в Европе наблюдалось преимущественное распространение аллеля *VRN-B1a* (Рис. 43). Аллель *VRN-B1c* встречался, главным образом, в восточно-европейских странах. Наиболее редкими аллелями как для Европы, так и для России были: *VRN-A1b* (делеция 20 пн в промоторе) и *VRN-D1a* (делеция 4.2 тпн в первом интроне). Только в Южной Европе их распространенность увеличивалась до 20% и 16.4%, соответственно (Рис. 43). Аллель *VRN-A1c* (делеция 5.5 тпн в первом интроне) не был обнаружен ни в одном из изученных сортов.

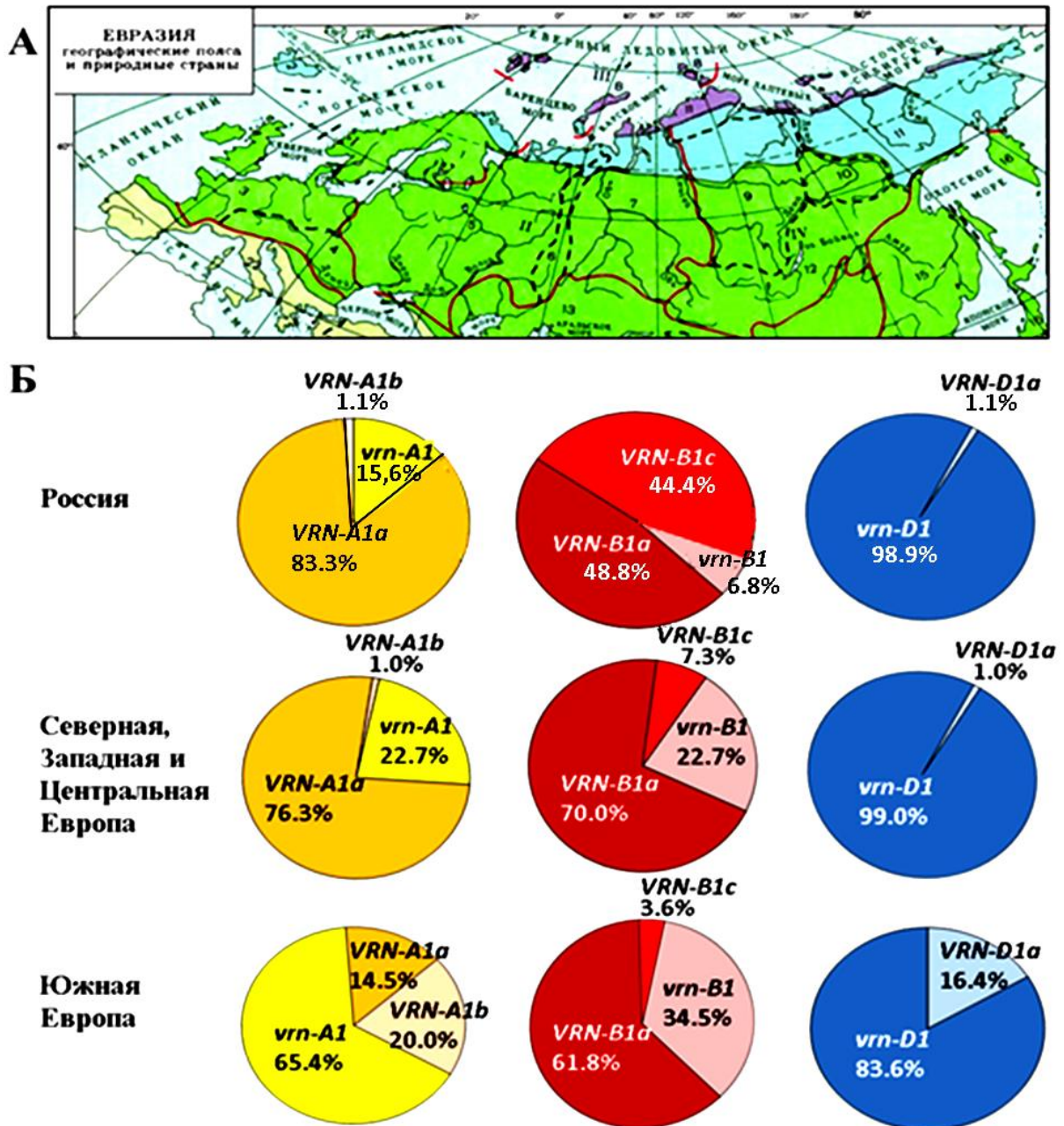
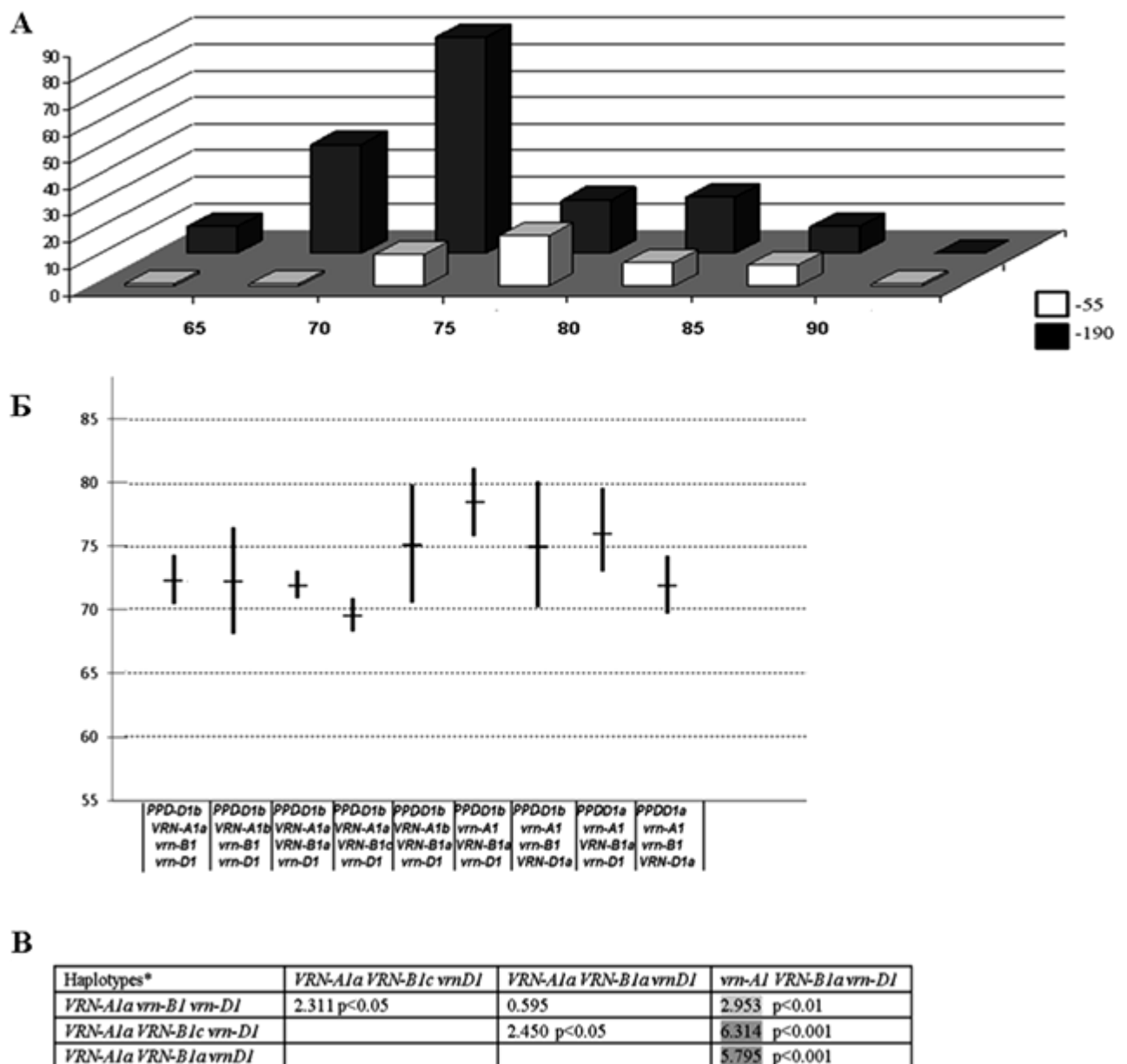


Рис. 43 А- Карта климатических зон, включая Европу и Россию. Зеленый цвет обозначает умеренную климатическую зону, светло-серый-субтропическую зону Южной Европы. Б- Диаграммы распространенности различных аллелей *VRN-1* генов среди изученных сортов яровой мягкой пшеницы из различных географических регионов (Shcherban et al., 2012; Shcherban et al., 2015a).

Европейские сорта можно разделить на две основные группы, различающиеся по сроку выколашивания: Южную группу и объединенную группу сортов Северной, Западной и Центральной Европы (Рис. 44А). Первая группа имеет в среднем на 5 дней более позднее выколашивание, по

сравнению со второй. Такое различие может быть обусловлено специфическим географическим распределением *VRN-1* генотипов (см. выше). В качестве подтверждения мы обнаружили у гаплотипа *vrn-A1 VRN-B1a vrn-D1* (распространенного в Южной Европе) статистически значимое ($p < 0.001$) увеличение срока колошения на 5-8 дней, по сравнению с гаплотипом с двумя доминантными генами *VRN-A1* и *VRN-B*, характерным для оставшейся части Европы (Рис. 44Б,В).



*представлены только гаплотипы с аллелем *Ppd-D1b*, для которых статистически значимые оценки могли быть выполнены (не менее 10 проанализированных сортов на гаплотип)

Рис. 44 А- Диаграмма распределения двух основных групп Европейских сортов яровой мягкой пшеницы по времени колошения: Южной группы (белые столбики)

и группы сортов Северной и Центральной Европы (черные столбики). Цифры по оси X- количество дней до колошения; по оси Y- количество сортов. Справа- общее количество сортов в каждой группе. Б- эффект различных *PPD-D1 / VRN-1* комбинаций на время колошения. Вертикальные линии с чертой в середине обозначают 95% доверительный интервал и среднее значение срока колошения для соответствующей группы аллелей. В- Значения коэффициента Стьюдента (Т) и соответствующего уровня значимости (р), показывающие различия по сроку колошения между наиболее распространенными *VRN-1* гаплотипами. Наиболее значимые различия выделены серым цветом (Shcherban et al. 2015a).

Таким образом, комбинация фотопериод- чувствительного аллеля *PPD-D1b* с двумя доминантными аллелями *VRN-A1* и *VRN-B1* представляет наиболее адаптивный генотип яровой гексаплоидной пшеницы для большей части территории Европы и России, за исключением Южных районов Европы, где получили распространение моногенно доминантные по *VRN-B1* (*VRN-D1*) гаплотипы. Последние могли иметь селекционное преимущество в субтропических климатических условиях, обеспечивая более длительный вегетационный период.

3.4.3. Анализ аллельного разнообразия генов *VRN-1* в составе ранних форм полиплоидных пшениц и их диплоидных предков

Изучение механизмов яровизации и их формирования в ходе эволюции невозможно без детального анализа происхождения аллелей *VRN-1* и их дивергенции, связанной с появлением яровых форм у полиплоидных и предшествующих им диплоидных видов пшениц. В качестве объекта для данной работы были использованы 80 образцов дикорастущего тетраплоидного вида пшеницы *T. dicoccoides* (геном ВВАА), 45 и 4 образца тетраплоидных видов *T. araraticum* и *T. timopheevii* (геном GGAA), соответственно, 160 образцов диплоидных видов *T. monococcum*, *T. boeoticum* и *T. urartu*, наиболее близких к А- геному полиплоидных пшениц и 23 образца *Ae. speltooides*, близкого к донору В(G) -генома (Табл. 3 приложения).

Для молекулярного анализа локусов *VRN-1* в составе указанных видов были использованы ранее разработанные комбинации праймеров, позволяющие маркировать участки промотора и первого интрона *VRN-1* (Табл. 5). Для более точной идентификации различных аллелей использовали CAPS-метод (см. Главу 2.8).

3.4.3.1. *T. dicoccoides*

Промоторный район

Чувствительность к яровизации у тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides* контролируется аллелями 2-х гомеологичных локусов: *VRN-A1* и *VRN-B1*. Почти все из 80 изученных образцов указанного вида давали ПЦР-продукт длиной ок. 0.7 тпн (Рис. 45а) с использованием праймеров, специфичных для промоторного района *VRN-A1* (Табл. 5). Спектры *Msp* I- гидролиза продуктов ПЦР можно разделить на два типа (Рис. 45b). Первый тип, характерный для подавляющего большинства изученных образцов, содержит два основных фрагмента длиной ~140 и 200 пн. Второй тип был обнаружен только в 3-х образцах *T. dicoccoides* и характеризуется фрагментом ~120 пн, замещающим фрагмент 140 пн. На основании ПЦР-скрининга для дальнейшего секвенирования ПЦР продуктов нами были отобраны образцы, представляющие оба рестрикционных паттерна.

Промоторные последовательности *VRN-A1* образцов IG 113301, IG 139189, IG 46297, k-5198, относящихся к первому рестрикционному паттерну (Рис. 45b) были полностью идентичны известной последовательности рецессивного аллеля *VRN-A1 T. dicoccoides* (AY747598) и содержали рестрикционный фрагмент *Msp* I длиной 138 пн. Следует отметить, что промоторные последовательности *VRN-A1* всех полиплоидных пшениц, описанных в базах данных содержат инсерцию 8 пн и дополнительный сайт узнавания *Msp* I, характерный также для аллеля *VRN-A1u T. urartu* (см. далее). Учитывая эти особенности, мы обозначили

соответствующий рецессивный аллель *T. dicoccoides* как *VRN-A1u'* (Рис. 46, 47; Табл. 10; Табл. 3 приложения).

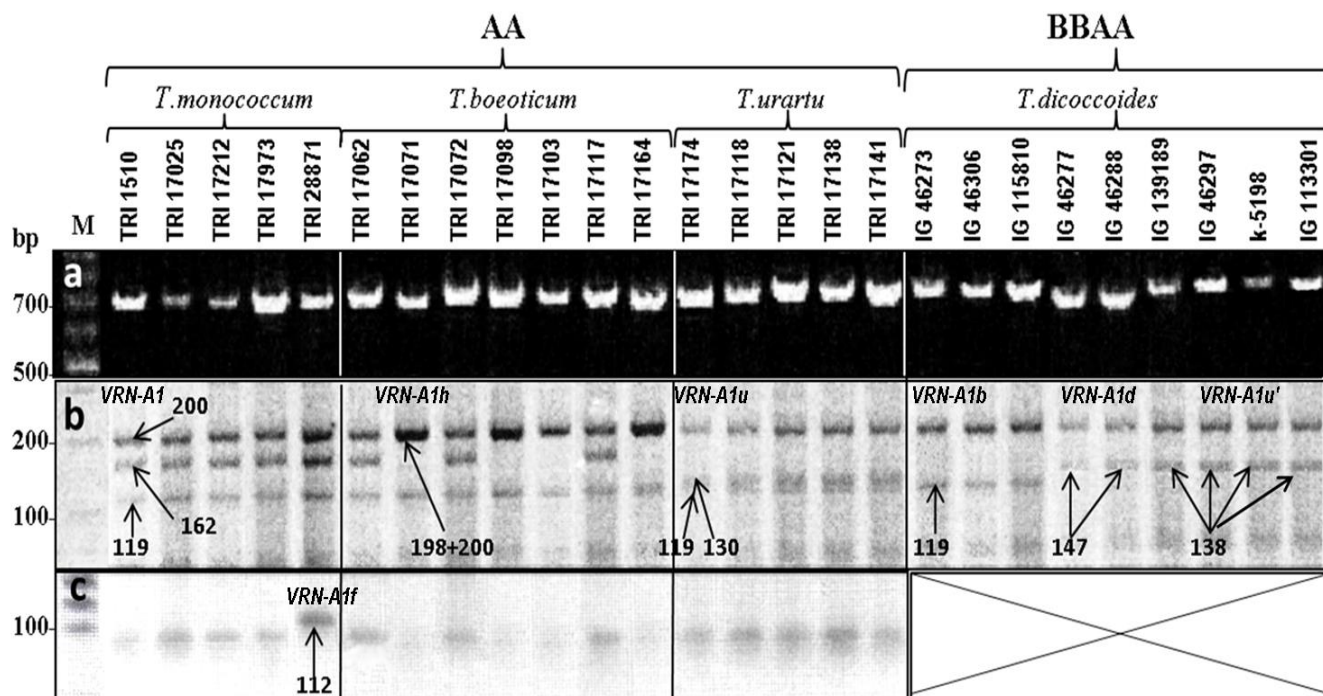


Рис. 45 а- ПЦР амплификация последовательностей промотора *VRN-A1* с помощью *VrnA1F/Int1R* праймеров. б- рестрикционный гидролиз *Msp* I соответствующих ПЦР- продуктов. с- ПЦР амплификация с праймерами *VRN1F_F/VRN1F_R*, с последующей обработкой эндонуклеазой рестрикции *Taq* I (детекция аллеля *VRN-A1f*). Номера образцов, названия видов и генотипы даны сверху. Основные фрагменты рестрикции длиной более 100 пн обозначены стрелками (Shcherban et al. 2015b).

Последовательности *VRN-1* образцов IG 46273, IG 46306 и IG 115810, представляющие второй тип, были идентичны ранее описанному аллелю *VRN-A1b* (Yan et al. 2004a), имеющему делецию 19 пн в промоторном районе (Рис. 46). Благодаря этой делеции после гидролиза *Msp* I появлялся фрагмент длиной 119 пн (Рис. 47).

Два из 80 образцов *T. dicoccoides* (IG46277 and IG 46288) давали немного укороченные ПЦР- продукты, по сравнению с другими образцами (Рис. 45а). При этом они практически не отличались от других образцов по картине гидролиза *Msp*I (Рис. 45b). Секвенирование показало, что эти образцы содержат ранее описанный аллель *VRN-A1d* (Yan et al. 2004a). По сравнению

с *VRN-A1b* аллелем, этот аллель имеет дополнительную делецию 32 пн, которая обуславливает фрагмент рестрикции длиной 147 пн (Рис. 46, 47).

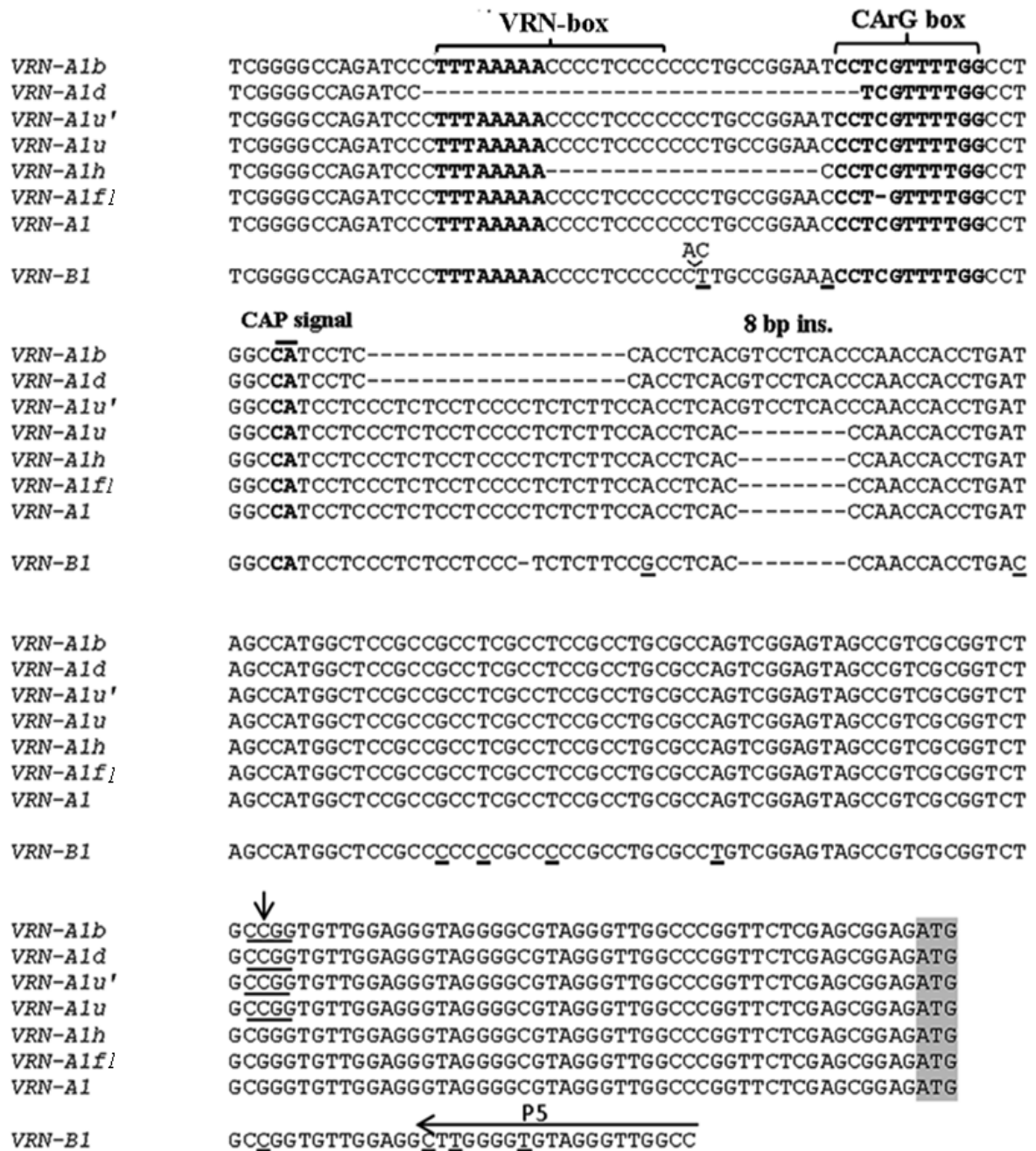


Рис. 46 Сравнение участка (~0.2 тпн) промоторной последовательности *VRN-1*, амплифицированной с помощью праймеров VrnA1F/Int1R (*VRN-A1*; ПЦР- продукт 0.7 тпн) и P2/P5 (*VRN-B1*; продукт 0.9 тпн). Локализация предполагаемых сигналов транскрипции (выделены жирным шрифтом) указана согласно данным Yan et al. (2004). ATG стартовый кодон обозначен серым цветом. Показаны: инсерция 8 пн (8 bp ins.) и обозначенная стрелкой нуклеотидная замена, генерирующая дополнительный сайт узнавания *Msp* 1 (подчеркнут). В составе *VRN-B1* подчеркнуты однонуклеотидные сайты, по которым наблюдаются различия между *VRN-A1* и *VRN-B1*. Последовательность *VRN-B1* является высоко консервативной среди 5-ти изученных образцов *T. dicoccoides* (Shcherban et al. 2015b).

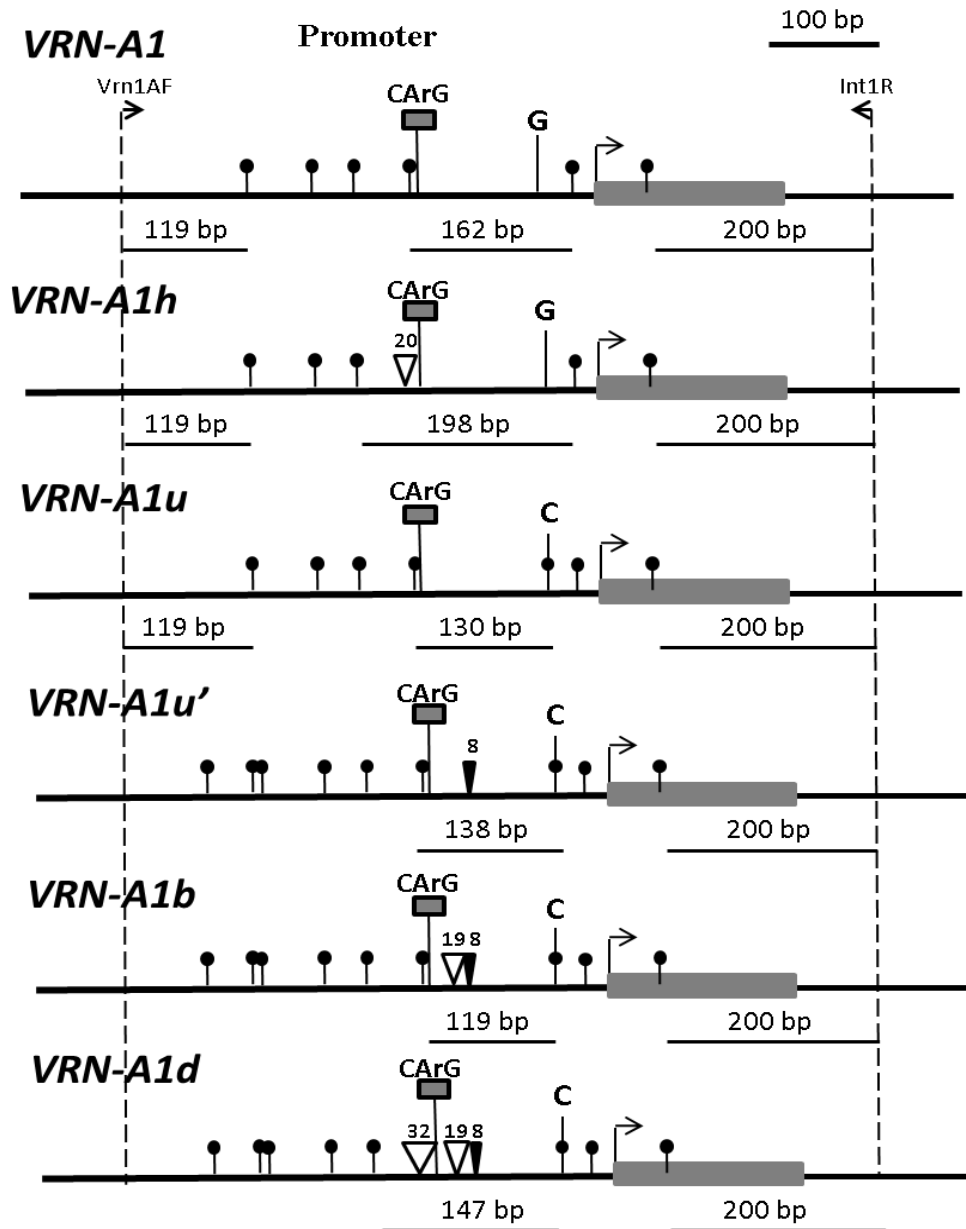


Рис. 47 Карта рестрикции *Msp* I промоторного района различных аллелей *VRN-1*. Стартовый кодон обозначен стрелкой в начале первого экзона (серый прямоугольник). Позиция специфических праймеров показана над схемой. Черными кружками обозначены сайты узнавания *Msp* I. Линиями с числами обозначена длина фрагментов рестрикции, превышающих 100 пн. Делеции и инсерции показаны белыми и черными треугольниками, соответственно, с указанием размеров. Указано расположение CArG- бокса и нуклеотидной замены G→C, генерирующей новый сайт узнавания *Msp* I (Shcherban et al. 2015b).

Для анализа локуса *VRN-B1* использовались праймеры P2/P5, которые амплифицируют продукт длиной примерно 0.9 тпн из состава промоторного района (Табл. 5). Никаких отличий между образцами не было обнаружено с

помощью ПЦР и последующей обработки *Msp* I (данные не представлены). На основании известных последовательностей *VRN-B1* *T. aestivum* (AY747602-04, AY616453, AY616456), *Msp* I рестрикционные фрагменты соответствовали ожидаемым: 494, 104 и 128 пн. Были секвенированы ПЦР продукты из 5 отобранных образцов различного происхождения (Табл. 3 приложения). Все 5 последовательностей были высоко гомологичны известным последовательностям *VRN-B1* (98-100% гомологии), за исключением минорных изменений, выявленных, главным образом, за пределами участка, содержащего предполагаемые консервативные транскрипционные сигналы (Рис. 46). Изученные последовательности *VRN-B1* помещены в базу данных Genbank под номерами: Ac.N. KM586661-65.

1-й интрон

Праймеры *Intr1/C/F* and *Intr1/AB/R* для 1-го интрона *VRN-A1* (Табл. 5; Рис. 48) первоначально использовались с целью идентификации рецессивного аллеля *T. aestivum* (Fu et al. 2005). Этот аллель содержит делецию 1.4 тпн в интроне 1, по сравнению с соответствующими аллелями *T. monosocum* и *T. boeoticum* (см. далее). Почти все изученные образцы *T. dicoccoides* давали ПЦР- продукты приблизительно 1 тпн, что свидетельствует о присутствии делеции, за исключением образцов k-5198, IG 139189 и IG 46297, для которых характерно полное отсутствие продуктов (Рис. 49c). Ранее, был выявлен *VRN-A1* аллель тетраплоидного образца 'Langdon' (AY747598), имеющий делецию 7.2 тпн в интроне 1. С использованием праймеров *Ex1/C/F* и *Intr1/A/R3* для детекции данного аллеля (Табл. 5; Рис. 48), три образца *T. dicoccoides* генерировали ПЦР продукт примерно 0.5 тпн (Рис. 49d) идентичный по первичной структуре соответствующей последовательности 'Langdon'. Мы обозначили этот аллель как *VRN-A1L* (Рис. 48; Табл. 10).

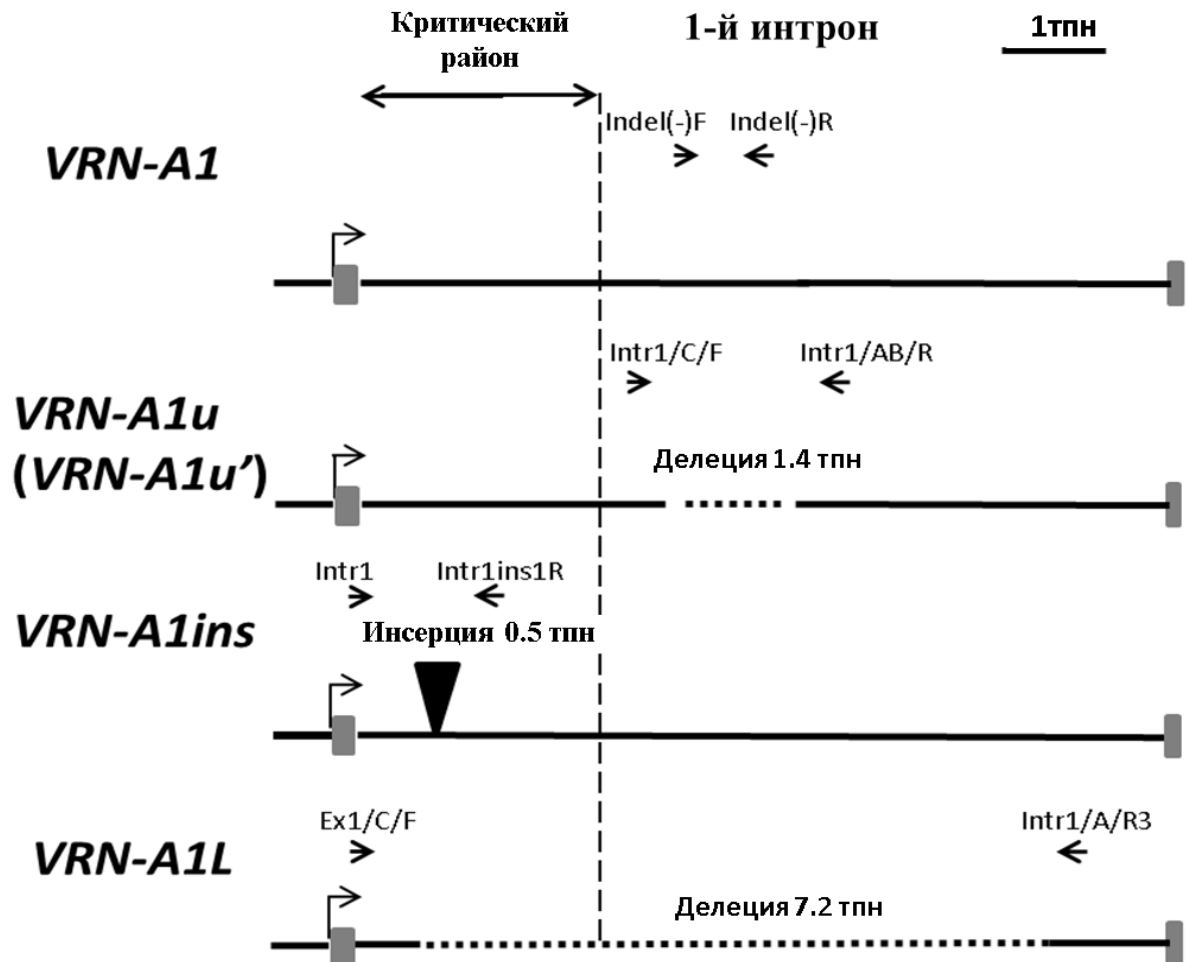


Рис. 48 Схема 1-го интрона *VRN-1* аллелей, выявленных у *T. dicoccoides*. Позиция специфических праймеров показана над схемой. Обозначены крупные делеции (прерывистые линии) и инсерция (черный треугольник) (Shcherban et al. 2015b).

Праймеры Intr1/B/F и Intr1/B/R4 были сконструированы в качестве положительного контроля для подтверждения отсутствия крупных мутаций (делеций или инсерций) в интроне 1 *VRN-B1* локуса (Fu et al. 2005) (Табл. 5). С использованием этих праймеров все образцы *T. dicoccoides* генерировали ПЦР продукт 1149 пн, свидетельствующий о присутствии исходной рецессивной формы *VRN-B1* (результат не представлен).

Таким образом, дикий тетраплоидный вид *T. dicoccoides* демонстрировал структурный полиморфизм как в составе промотора, так и в районе 1-го интрона локуса *VRN-A1*, тогда как локус *VRN-B1* проявлял значительный

консерватизм структуры. Для ответа на вопрос о происхождении выявленного полиморфизма *VRN-A1* (возник ли он на тетраплоидном уровне, или у диплоидных доноров А генома) мы провели анализ диплоидных видов-предполагаемых доноров.

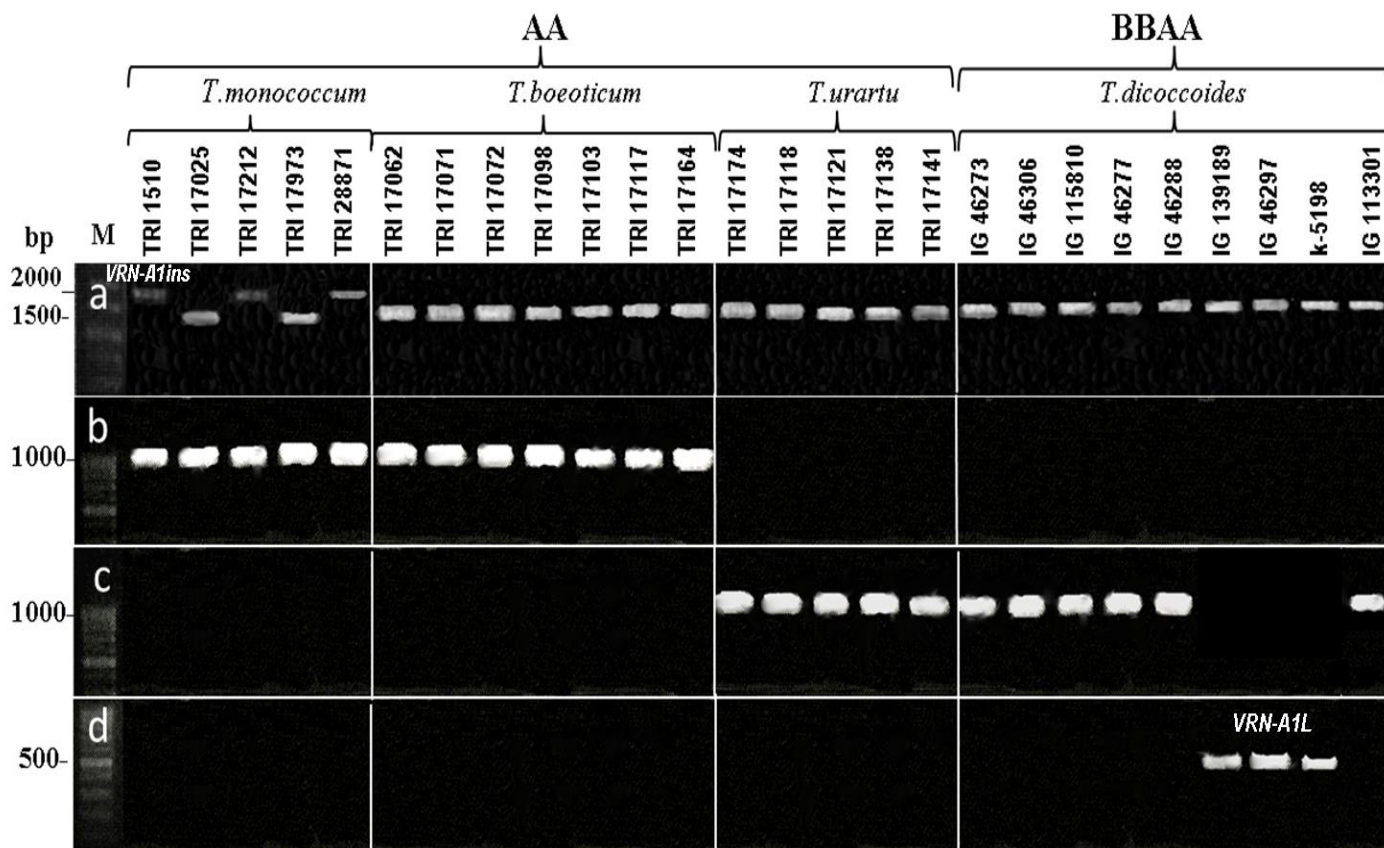


Рис. 49 ПЦР амплификация последовательностей 1-го интрона *VRN-A1* с помощью праймеров Intr1/Intr1insR (a), Indel(-)F/Indel(-)R (b), Intr1/C/F//Intr1/AB/R (c), Ex1/C/F//Intr1/A/R3 (d) (Shcherban et al. 2015b).

3.4.3.2 Диплоидные виды *Triticum*- предшественники А- генома

Промоторный район

Мы проанализировали разнообразие промоторных последовательностей *VRN-1* в 160 образцах диплоидных видов *T. monococcum*, *T. boeoticum* и *T. urartu*, - предполагаемых предшественников А- генома (Табл. 3 приложения). Как и тетраплоидные образцы, диплоиды давали ПЦР продукты в районе ~0.7 тпн с использованием праймеров Vrn1AF и Int1R (Рис. 45а). В

результате гидролиза *Msp* I этих продуктов были получены 3 паттерна (Рис. 45b). Первый паттерн содержал фрагменты длиной ~ 119, 162 и 200 пн, характерные для ранее изученного рецессивного аллеля *VRN-A1 T. monosocum* (AY188331). Этот паттерн демонстрировали все изученные образцы *T. monosocum* (61) и 39 образцов *T. boeoticum* (Табл. 3 приложения). Оставшиеся 20 образцов *T. boeoticum* имели паттерн рестрикции без среднего фрагмента 162 пн и с интенсивным фрагментом 200 пн. Все образцы *T. urartu* отличались от двух других видов по наличию двойной полосы 120-130 пн (Рис. 45b). Для более детального анализа аллельного полиморфизма, мы отобрали набор образцов, представляющих 3 указанных паттерна и секвенировали соответствующие ПЦР продукты (Табл. 10).

Среди 5-ти отобранных образцов *T. monosocum*, четыре имели промоторные *VRN-A1* последовательности идентичные ранее изученному *VRN-A1* аллелю (AY188331) (Табл. 10). Образец TRI 28871 имел делецию 1 пн в составе CArG- бокса (Рис. 46). Этот аллель был ранее идентифицирован в яровом образце *T. monosocum* и обозначен как *VRN-A1f* (Yan et al. 2003). Мы обозначили его как *VRN-A1f1*, чтобы отличить от аллеля *VRN-A1f*, открытого позднее и характерного для тетраплоидных пшениц группы *Timopheevii* (см. гл. 3.4.3.3). Скрининг всех диплоидных образцов с помощью CAPS- маркера (Dubcovsky et al. 2006) позволил выявить фрагмент 112 пн, характерный для *VRN-A1f1* (Рис. 45c) дополнительно у трех образцов *T. monosocum* (Табл. 3 приложения). Последующее секвенирование подтвердило присутствие *VRN-A1f1* в данных образцах.

Из семи отобранных образцов *T. boeoticum*, три имели промоторные последовательности, идентичные рецессивному аллелю *VRN-A1 T. monosocum* (Табл. 10). Последовательности оставшихся 4-х образцов были идентичны ранее описанному *VRN-A1h* аллелю (GQ451745), который отличается от *VRN-A1* делецией 20 пн вблизи CArG- бокса (Рис. 46). Эта делеция приводит к потере одного сайта узнавания *Msp* I (Рис. 47), что объясняет отсутствие фрагмента 160 пн и увеличенную интенсивность

фрагмента 200 пн, за счет наложения фрагмента 198 пн (Рис. 45b). Таким образом, 20 образцов *T. boeoticum*, демонстрирующих этот паттерн, по видимому, являются носителями *VRN-A1h*, тогда как оставшиеся образцы вероятно содержат рецессивный аллель *VRN-A1* (Табл. 3 приложения).

1-й интрон

Сравнение известных *VRN-A1* последовательностей из баз данных по 1-му интрону обнаружило две крупных мутации (Рис. 48). Инсерция 0.5 тпн (*VRN-A1ins*) была выявлена ранее у двух яровых образцов *T. monococcum* вблизи 5' конца интрона 1 (Dubcovsky et al. 2006). Делеция 1.4 тпн, локализованная на расстоянии примерно 4 тпн от старта интрона была найдена во всех известных *VRN-A1* последовательностях, выделенных их полиплоидных видов пшениц, по сравнению с *T. monococcum*.

Мы сконструировали специфические праймеры, фланкирующие обе мутации, для того, чтобы исследовать вариацию 1-го интрона *VRN-A1* у трех диплоидных видов (Табл. 10; Рис. 48). Праймеры Indel(-)F и Indel(-)R позволяют идентифицировать *VRN-A1* аллель *T. monococcum*, не имеющий делеции 1.4 тпн, по ожидаемому ПЦР продукту около 1 тпн. Все образцы *T. monococcum* и *T. boeoticum* давали этот продукт, тогда как ни один образец *T. urartu* не давал его (Рис. 49b). Праймеры Intr1/C/F и Intr1/AB/R, фланкирующие делецию 1.4 тпн были использованы в качестве положительного контроля для установления присутствия этой делеции у *T. urartu* (Табл. 10; Рис. 48). Как и в случае *T. dicoccoides* (см. выше), все образцы *T. urartu* давали продукт ок. 1 тпн, отсутствующий у всех образцов *T. monococcum* и *T. boeoticum*, что подтверждает предыдущий результат (Рис. 49c). Следовательно, делеция 1.4 тпн в интроне 1 является специфическим маркером для *VRN-A1u* аллеля *T. urartu* и *VRN-A1u'* аллеля полиплоидных видов, содержащих А- геном (Табл. 3 приложения).

Табл. 10 Аллельные варианты *VRN-A1* гена в отобранном наборе образцов диплоидных видов *Triticum* и тетраплоидного *T. dicoccoides* (Shcherban et al. 2015b).

Виды (геном)	Каталожный номер образца	Тип развития (Озимый (W)/ Яровой (S))	<i>VRN-A1</i> структурные формы*			Аллели**	GenBank Ac.N.	Гомологичные п-ти из GenBank
			Промотор	Интрон 1				
				Инсерция 0.5 тпн	Делеции 1.4 тпн/7.2тпн			
<i>T. monococcum</i> (AA)	TRI 1510	S	<i>VRN-A1</i>	+	-/-	<i>Vrn-A1ins</i>	KM586653	AY188331
	TRI 17025	S	<i>VRN-A1</i>	-	-/-	<i>vrn-A1vrn2</i>	-/-	-/-
	TRI 17212	S	<i>VRN-A1</i>	+	-/-	<i>Vrn-A1ins</i>	-/-	-/-
	TRI 17973	S	<i>VRN-A1</i>	-	-/-	<i>vrn-A1VRN-2</i>	-/-	-/-
	TRI 28871	S	<i>VRN-A1fl</i>	+	-/-	<i>Vrn-A1fl</i> <i>Vrn-A1ins</i>	KM586656	DQ146421
<i>T. boeoticum</i> (AA)	TRI 17062	W	<i>VRN-A1</i>	-	-/-	<i>vrn-A1</i>	KM586653	AY188331
	TRI 17071	S	<i>VRN-A1h</i>	-	-/-	<i>VRN-A1h</i>	KM586657	GQ451745
	TRI 17072	S	<i>VRN-A1</i>	-	-/-	<i>vrn-A1VRN-2</i>	KM586653	AY188331
	TRI 17098	S	<i>VRN-A1h</i>	-	-/-	<i>VRN-A1h</i>	KM586657	GQ451745
	TRI 17103	W	<i>VRN-A1h</i>	-	-/-	<i>VRN-A1h</i>	-/-	-/-
	TRI 17117	W	<i>VRN-A1</i>	-	-/-	<i>vrn-A1</i>	KM586653	AY188331
	TRI 17164	W	<i>VRN-A1h</i>	-	-/-	<i>VRN-A1h</i>	KM586657	GQ451745
<i>T. urartu</i> (AA)	TRI 17174	W	<i>VRN-A1u</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u</i>	KM586659	GQ482970
	TRI 17118	W	<i>VRN-A1u</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u</i>	-/-	-/-
	TRI 17121	W	<i>VRN-A1u</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u</i>	-/-	-/-
	TRI 17138	W	<i>VRN-A1u</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u</i>	-/-	-/-
	TRI 17141	W	<i>VRN-A1u</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u</i>	-/-	-/-
<i>T. dicoccoides</i> (BBAA)	IG 113301	W	<i>VRN-A1u'</i>	-	+/-	<i>vrn-A1u'</i>	KM586660	AY747598
	IG 46273	W	<i>VRN-A1b</i>	-	+/-	<i>VRN-A1b</i>	KM586654	AY616461
	IG 46306	W	<i>VRN-A1b</i>	-	+/-	<i>VRN-A1b</i>	-/-	-/-
	IG 115810	W	<i>VRN-A1b</i>	-	+/-	<i>VRN-A1b</i>	-/-	-/-
	IG 46277	S	<i>VRN-A1d</i>	-	+/-	<i>Vrn-A1d</i>	KM586655	AY616462
	IG 46288	S	<i>VRN-A1d</i>	-	+/-	<i>Vrn-A1d</i>	-/-	-/-
	IG 139189	S	<i>VRN-A1u'</i>	-	?/+	<i>Vrn-A1L</i>	KM586658	AY747598
	IG 46297	S	<i>VRN-A1u'</i>	-	?/+	<i>Vrn-A1L</i>	-/-	-/-
	k-5198	S	<i>VRN-A1u'</i>	-	?/+	<i>Vrn-A1L</i>	-/-	-/-

*- Во всех случаях промоторный район был секвенирован; инсерции и делеции в интроне 1 определялись с помощью ПЦР (см. Табл. 5).

** - *vrn-A1*, *vrn-A1u*, *vrn-A1u'* - рецессивные аллели (исходные структурные формы); *Vrn-A1* - доминантные аллели; *VRN-A1* - структурно модифицированные формы с неустановленным влиянием на тип развития; Примеры несоответствия между озимым типом и мутантными *VRN-A1* аллелями выделены серым цветом.

-Подчеркнуты два образца, *vrn-1VRN-2* генотипы которых противоречат их яровому типу развития.

Пять отобранных образцов *T. urartu* имеют одну и ту же промоторную последовательность *VRN-A1* (Табл. 10), имеющую 98% гомологии к соответствующей последовательности *VRN-A1* *T. monosocum*. Из нескольких найденных нуклеотидных замен, одна (G→C, позиция -48 от ATG кодона) привела к появлению нового сайта узнавания *Msp* I (Рис. 46, 47). Это объясняет появление фрагмента 130 пн, наряду с потерей фрагмента 160 пн (Рис. 45b). Основываясь на проведенном рестрикционном анализе всех трех диплоидных видов, указанная нуклеотидная замена является видо-специфичной для *T. urartu*, поэтому мы обозначили соответствующий аллель как *VRN-A1u* (Табл. 3 приложения).

С использованием праймеров *Intr1/Intr1insR*, 19 образцов *T. monosocum* показывали ПЦР продукт ~ 2 тпн, что свидетельствует о наличии у этих образцов аллеля *VRN-A1ins* (образцы TRI 1510, 17212 на Рис. 49а; Табл. 3 приложения). Оставшиеся 42 образца *T. monosocum* содержали фрагмент ок. 1.5 тпн, указывающий на отсутствие инсерции *VRN-A1ins*. Аналогичным образом, *VRN-A1ins* не был обнаружен у *T. urartu* и *T. boeoticum*, за исключением одного образца *T. boeoticum*, который, вероятно, был неправильно отнесен к этому виду (Табл. 3 приложения).

3.4.3.3 Тетраплоидные пшеницы группы *Timopheevii*

Группа *Timopheevi* включает 2 близкородственных вида тетраплоидных пшениц: *T. araraticum* Jakubz. и *T. timopheevii* (Zhuk) Zhuk, имеющих GGAA геном. Первый вид является дикорастущим и возник в результате гибридизации между видами *T. urartu* (AA, $2n = 14$) и *Ae. speltoides* (SS, $2n = 14$), предполагаемыми донорами А- и G- геномов, соответственно (Dvorak and Zhang 1990; Huang et al. 2002; Kilian et al. 2007). *T. timopheevii* является культурным видом, произошедшим от первого в ограниченном районе западной Грузии (Mitrofanova et al. 2016). Характерной особенностью этих двух видов является то, что *T. araraticum* представляет преимущественно озимый вид, тогда как *T. timopheevii*- яровой (Magness et al. 1971; Goncharov

2002). Этот факт делает данные виды уникальной природной моделью для изучения механизмов возникновения яровых форм у аллополиплоидов пшеницы.

Промоторный район

Для анализа промоторного района *VRN-A1* локуса у тетраплоидных пшениц *T. araraticum* и *T. timopheevii* была использована та же комбинация праймеров, что и в случае *T. dicoccoides* (Табл. 5). Все изученные образцы обоих видов давали ПЦР- продукт размером 0.65 тпн (Рис. 50а). Нами были секвенированы эти продукты из выборки образцов, представляющих указанные виды (Табл. 11).

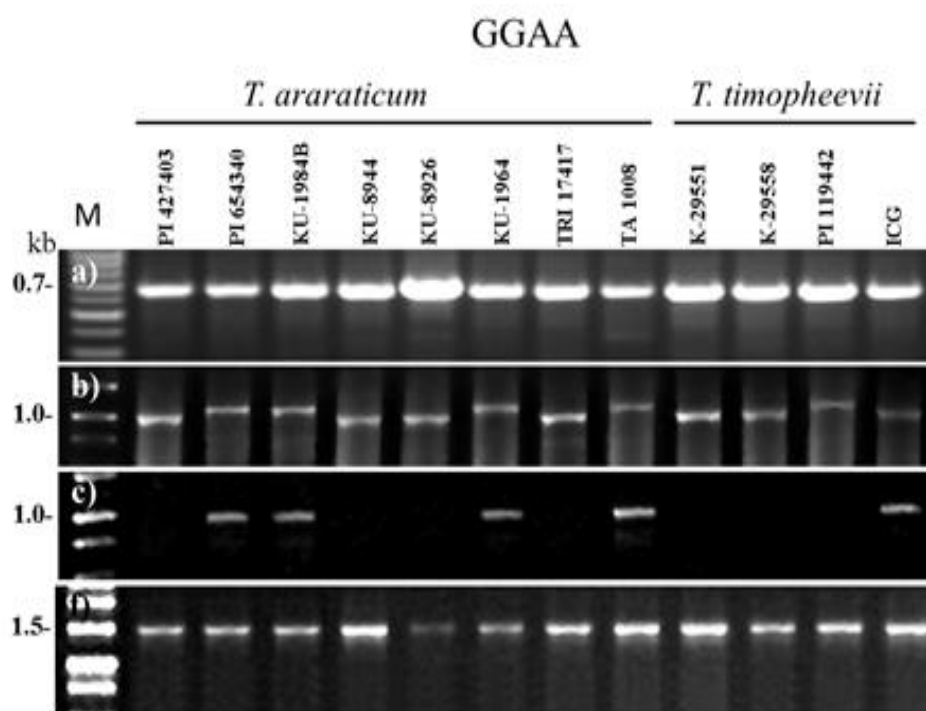


Рис. 50 ПЦР-амплификация с праймерами: VrnA1F /Int1R (a), P2/P5 (b), Intr1/C/F // Intr1/AB/R (c), Ex1/C/F// Intr1/B/R4 (d) (Shcherban et al. 2016b).

Последовательности всех изученных образцов проявляли 99% гомологии друг к другу и ранее изученным промоторным последовательностям аллеля *VRN-A1f* из *T. timopheevii* и *T. araraticum* (GQ451751-451753 and GQ451762-451765, соответственно). Данный аллель имеет делецию 50 пн в позиции -63 пн от стартового ATG кодона (Рис. 51).

Табл. 11 Аллельные варианты *VRN-A1* и *VRN-G1* генов в выборке образцов тетраплоидных пшениц группы *Timopheevii* (Shcherban et al. 2016b).

Вид (геном)	Каталожный номер образца (страна происхождения)	Тип развития*	<i>VRN-A1</i> **			<i>VRN-A1</i> аллели	<i>VRN-G1</i> *		<i>VRN-G1</i> аллели	GenBank Ac.№
			Промотор	Интрон 1			Промотор Инсерция 0.2 тпн	Интрон 1 (<i>vrn-G1</i>)		
				Инсерция 0.4 тпн	Делеция 2.7 тпн					
<i>T. araraticum</i> (GGAA)	PI 427403 (Ирак)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	+	<i>VRN-A1f-del</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	<i>VRN-G1</i> : KX344116
	PI 654340 (Turkey)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	-	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>vrn-G1a</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344106; <i>VRN-G1a</i> : KX344117
	KU-1984B (Turkey)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	-	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>VRN-G1a</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344101
	KU-8944 (Иран)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	+	<i>VRN-A1f-del</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	-
	KU-8926 (Turkey)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	+	<i>VRN-A1f-del</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	-
	KU-1964 (Turkey)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	-	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>VRN-G1a</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344102
	TRI 17417 (Azer.)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	+	<i>VRN-A1f-del</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	-
	TA 1008 (Turkey)	W	<i>VRN-A1f</i>	-	-	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>VRN-G1a</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344103
<i>T. timopheevii</i> (GGAA)	K-29551 (Georgia)	S	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>Vrn-A1f-del/ins</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	-
	K-29558 (Georgia)	S	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>Vrn-A1f-del/ins</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	-
	PI 119442 (Turkey)	S	<i>VRN-A1f</i>	+	+	<i>Vrn-A1f-del/ins</i>	+	+	<i>VRN-G1a</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344107; <i>VRN-G1a</i> : KX344118
	ICG (unknown)	S	<i>VRN-A1f</i>	+	-	<i>Vrn-A1f-ins</i>	-	+	<i>vrn-G1</i>	<i>VRN-A1f</i> : KX344108

*W- озимый тип; S-яровой тип

**Во всех случаях промоторный район был секвенирован; инсерции и делеции в первом интроне определяли с помощью ПЦР и частичного секвенирования. Аллели обозначены как в Табл. 10.

Для анализа промоторного района локуса *VRN-G1* использовалась комбинация P2/P5 (Рис. 50b). 41 образец *T. araraticum* и 3 образца *T. timopheevii* давали ПЦР-продукт ожидаемой длины, тогда как 4 образца *T. araraticum* и 1 образец *T. timopheevii* генерировали продукт большей длины~1.1 тпн. Секвенирование обоих продуктов из отдельных образцов показало их высокую гомологию к известным аллелям *VRN-G1* и *VRN-G1a* (KR055682 и GQ451755, соответственно). Последний аллель содержит вставку миниатюрного транспозона с инвертированными повторами (MITE) длиной

215 пн на расстоянии 99 пн от стартового кодона (Рис. 51). Таким образом, аллель *VRN-G1*, близкий к рецессивной форме гена, характерен для большинства образцов обоих тетраплоидных видов, в то время как аллель *VRN-G1a* присутствует у меньшего количества образцов этих видов.

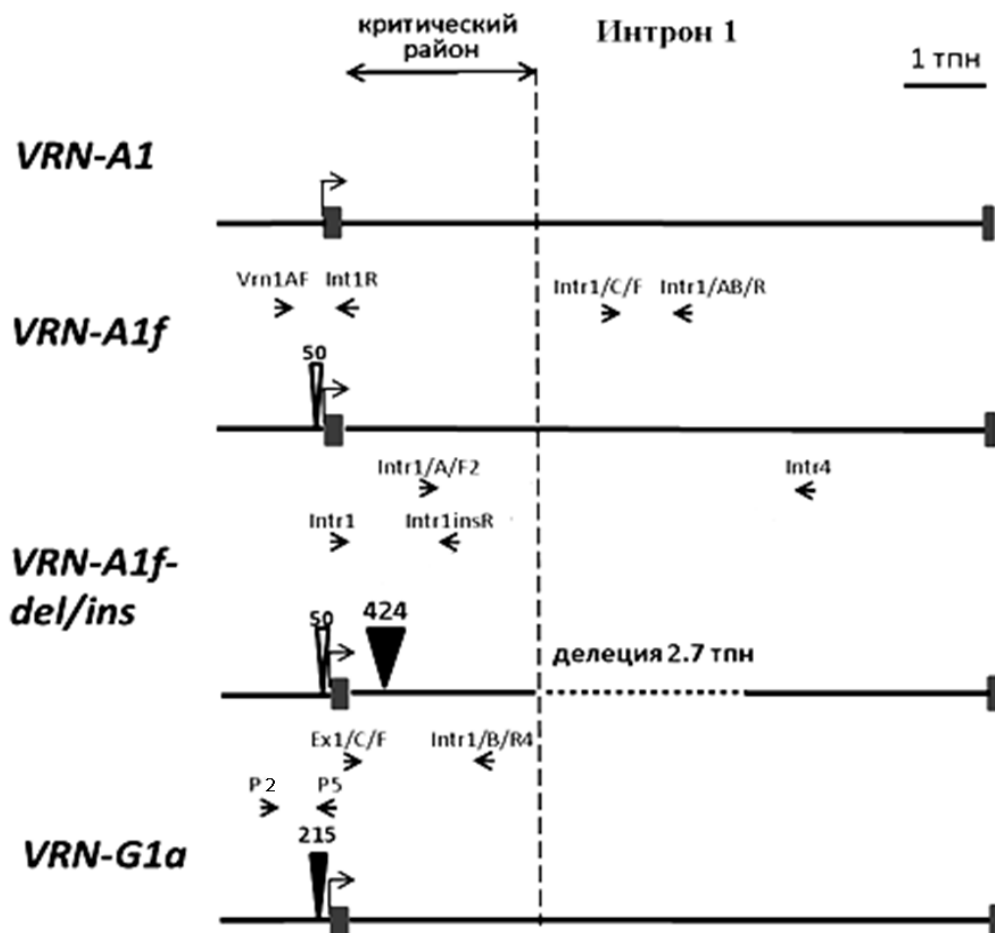


Рис. 51 Частичная схема различных аллелей *VRN-1* тетраплоидных видов группы *Timopheevii*, включающая промотор, экзон 1 и интрон 1. Делеции и инсерции МІТЕ указаны белыми и черными треугольниками, соответственно, с указанием длины в пн (Shcherban et al. 2016b).

1-й интрон

Пара праймеров *Intr1/C/F* и *Intr1/AB/R* использовалась для подтверждения рецессивной формы интрона 1 *VRN-A1*. 42 образца *T. araraticum* и 1 образец *T. timopheevii* генерировали ПЦР- продукт ожидаемой длины примерно 1 тпн (Рис. 50с). Остальные образцы обоих видов не давали никаких продуктов с этой комбинацией праймеров. Для

идентификации возможных изменений 1-го интрона в этих образцах нами были сконструированы праймеры к различным участкам интрона (Рис. 51) и проведена ПЦР с отдельными комбинациями.

Центральная часть интрона 1, ограниченная праймерами Intr1/A/F2 и Intr4 (Рис. 51) в случае рецессивного аллеля не может быть амплифицирована из-за ее крупного размера ~ 5 тпн. Однако, для 4-х образцов *T. araraticum* и 3-х образцов *T. timopheevii* был получен продукт длиной 2.5 тпн с этими праймерами (результат не представлен). Это указывает на присутствие в центральной части интрона большой делеции, предотвращающей амплификацию с парой Intr1/C/F // Intr1/AB/R (Рис. 51). Концевое секвенирование продукта позволило установить границы делеции и ее размер - 2.7 тпн, в сравнении с известным рецессивным аллелем *VRN-A1*. Следовательно, указанная делеция в интроне 1 *VRN-A1* характерна для 3-х изученных образцов *T. timopheevii* и 4-х из 46 образцов *T. araraticum* (Табл. 12).

С использованием комбинации Intr1// Intr1insR, все образцы *T. timopheevii* генерировали более длинный продукт по сравнению с образцами *T. araraticum* (результат не представлен). Секвенирование этого продукта показало наличие инсерции MITE длиной 424 пн на расстоянии 435 пн от конца экзона 1 (Рис. 51). Аналогичная инсерция характерна для аллеля *VRN-A1f-like T. militinae* (Ivanicova et al. 2016). Следовательно, в отличие от делеции 2.7 тпн, инсерция MITE 0.4 тпн является специфичным маркером для аллеля *VRN-A1 T. timopheevii*.

Мы обозначили аллели *VRN-A1f* с различными мутациями в первом интроне как *VRN-A1f-del*, *VRN-A1f-ins* и *VRN-A1f-del/ins* (делеция 2.7 тпн, инсерция 0.4 тпн и обе мутации одновременно, соответственно) (Табл. 12).

Пара праймеров Ex1/C/F и Intr1/B/R4 была использована для подтверждения рецессивной формы интрона 1 *VRN-G1*, не содержащей крупных инсерций или делеций (Рис. 51). Все образцы *T. araraticum* и *T.*

timopheevii давали продукт 1530 пн, характерный для интактного интрона (Рис. 50d).

Таким образом, тетраплоидные пшеницы *T. araraticum* и *T. timopheevii* проявляют наибольший полиморфизм в составе 1-го интрона *VRN-A1*, включая инсерцию MITE 0.4 тпн, специфичную для *T. timopheevii*. В отличие от *VRN-A1*, локус *VRN-G1* показал отсутствие вариации в 1-м интроне, хотя в промоторе вариация была обнаружена (аллель *VRN-G1a*) у некоторых образцов обоих видов.

3.4.3.4 *Ae. speltoides*

Для изучения структурных изменений, сопровождающих эволюционный переход от диплоидного предшественника В и G- геномов- *Ae. speltoides* к первым аллотетраплоидным видам, содержащим эти геномы, мы впервые исследовали аллельный полиморфизм локуса *VRN-1* у данного вида.

Праймеры P2 и P5, использованные для амплификации промоторного района *VRN-1* у тетраплоидных видов, не давали ПЦР- продукта в случае *Ae. speltoides*. Тестирование разных комбинаций праймеров позволило подобрать комбинацию P8/P10 (Табл. 5), дающую продукт ~ 0.9 тпн у всех исследованных образцов *Ae. speltoides* (Табл. 3 приложения). Указанный продукт был секвенирован у семи случайно отобранных образцов. Все последовательности оказались высоко-гомологичными друг другу (> 98% гомологии). Наибольшая вариация (замещения нуклеотидов, делеции до 4 пн) была отмечена выше консервативного района, содержащего предполагаемые сайты регуляции транскрипции, который оставался без существенных изменений, в том числе, по сравнению с аналогичными районами полиплоидных видов (Рис. 46). По сравнению с последними, последовательности *Ae. speltoides* содержали несколько делеций/инсерций, расположенных выше консервативного района, в том числе, самую крупную делецию- 21 пн. Следует отметить, что по структуре промоторного района

VRN-1 Ae. speltoides примерно одинаково удален от линии *T. dicoccoides* и от линии *Timopheevii* (уровень гомологии 92-93% в обоих случаях).

Все изученные образцы *Ae. speltoides* не давали ПЦП- продукта 1.5 тпн с праймерами Ex1/C/F и Intr1/B/R4, использованными для маркирования района 1-го интрона у тетраплоидных видов (Табл. 5). Вместо Intr1/B/R4 мы апробировали праймер Intr1/D/R4, имеющий тот же сайт отжига, но с двумя нуклеотидными заменами, специфичными для D- генома *Ae. tauschii* (Fu et al. 2005). В результате был получен ожидаемый продукт у всех изученных образцов *Ae. speltoides*.

Таким образом, полученные результаты показали, что при формировании первых тетраплоидных видов структура регуляторных участков промотора и 1-го интрона локуса *VRN-1* в составе В/G- генома, унаследованного от *Ae. speltoides*, не претерпела значительных изменений, за исключением района, лежащего выше 0.5 тпн от стартового кодона.

3.4.3.5. Оценка связи полиморфизма *VRN-1* с типом развития у тетраплоидных образцов пшеницы и их диплоидных предков

Чтобы оценить влияние аллелей *VRN-1* на чувствительность к яровизации у диплоидных и тетраплоидных пшениц, мы исследовали тип развития (см. Материалы и Методы) у 38 образцов, содержащих как рецессивные, так и структурно-модифицированные формы *VRN-1* генов, (Табл. 10, 11).

У всех изученных образцов *T. araraticum* аллели *VRN-A1f*, *VRN-A1f-del* и *VRN-G1a* были связаны с озимым образом жизни, что указывает на то, что изменения в составе этих аллелей (промотора и 1-го интрона) никак не влияют на чувствительность к яровизации. Все 4 образца *T. timopheevii* с аллелями *VRN-A1f-del/ins* (инсерция + делеция в интроне 1) и *VRN-A1f-ins* (только инсерция в интроне 1) представляли яровой тип (Табл. 11).

Следовательно, инсерция транспозона MITE в составе *VRN-A1* локуса, по видимому, индуцировала образование яровых форм *T. timopheevii*.

Что касается тетраплоидного вида *T. dicoccoides*, аллель *VRN-A1b* был связан с озимой формой у всех трех образцов, несущих этот аллель, тогда как *VRN-A1d* и *VRN-A1L* строго ассоциировались с яровым типом развития (Табл. 10). Образец IG 113301 с рецессивным *VRN-A1* геном, как и ожидалось, представлял озимый тип.

Следует отметить, что в двух образцах *T. monosocum* и одном образце *T. boeoticum* рецессивная форма *VRN-A1* (*VRN-A1* промотор, нет инсерции в 1-м интроне) была связана с яровым типом развития, подразумевая участие других генов в определении этого признака. Четыре образца *T. monosocum*, содержащих *VRN-A1f1* аллель в сочетании с *VRN-A1ins* относились к яровому типу. Из 4-х образцов *T. boeoticum*, несущих аллель *VRN-A1h*, два имели яровой тип, тогда как два других были озимыми. Все 5 образцов *T. urartu* с одинаковым *VRN-A1u* аллелем проявляли озимый тип (Табл. 10).

Все 7 исследованных образцов *Ae. speltoides* относились к озимым формам (Табл. 3 приложения).

Заключение к главе 3.4.

В настоящей работе была поставлена задача: с использованием большой коллекции образцов видов провести анализ структурного полиморфизма локусов *VRN-1* у аллополиплоидов пшеницы и их диплоидных предков как модели структурно-функциональной дивергенции гомеологичных генов в процессе аллополиплоидизации. Проведенная ранее различными авторами оценка аллельного полиморфизма *VRN-1* в различных сортах мягкой пшеницы, а также образцах ее ди- и полиплоидных предшественников позволяет предположить, что мутации в 2-х некодирующих районах данного гена- промоторе и первом интроне могут быть связаны с различной реакцией на яровизацию (озимый и яровой типы) и определять различия по сроку колошения в зависимости от внешних факторов. Однако, чтобы более

целенаправленно проводить столь масштабное исследование, необходимо точно идентифицировать те районы гена, которые обуславливают различия по изучаемому признаку. С этой целью мы вначале провели анализ полной первичной структуры аллелей *VRN-B1* гена у двух почти- изогенных линий мягкой пшеницы, имеющих достоверное различие по сроку колошения. Анализ показал, что на фоне почти идентичных последовательностей кодирующего и промоторного районов гена имелись существенные отличия у этих линий по структуре 1-го интрона, а именно, делеция и дупликация в составе 5'- фланкирующей его части у одной из линий, имеющей более короткий срок колошения (аллель *VRN-B1c* от сорта «Саратовская 29»). Анализ экспрессии трех доминантных аллелей *VRN-1*, имеющих мутации в разных регуляторных районах (*Vrn-A1*- инсерция в промоторе; *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a*- делеции в 1-м интроне) в составе соответствующих почти-изогенных линий показал отрицательную корреляцию между уровнем транскрипции данных аллелей и сроком колошения линий так, что иерархия уровней транскрипции $Vrn-A1 > Vrn-B1c > Vrn-B1a$ соответствует срокам $iBz1Vrn-A1 < iBz1Vrn-B1c < iBz1Vrn-B1a$. Кроме того, было показано, что транскрипция доминантного аллеля *VRN-1* в составе мягкой пшеницы индуцирует транскрипцию двух других гомеологичных рецессивных аллелей (координированная транскрипция гомеологов). Таким образом, анализ экспрессии аллелей *VRN-1* с различными мутациями в промоторе и первом интроне показал прямую связь между этими мутациями и вариацией срока колошения у соответствующих почти- изогенных линий. В дальнейшем, эти регуляторные районы были выбраны в качестве мишеней при анализе структурной дивергенции *VRN-1* у мягкой пшеницы и ее предшественников.

На материале большой коллекции сортов мягкой пшеницы, представляющих различные эколого- географические районы Европы, России с прилегающими территориями проведена оценка ассоциации полиморфизма основных регуляторных районов *VRN-1* с реакцией на

яровизацию и сроком колошения. Было показано, что расширение ареала произрастания мягкой пшеницы до зон умеренного климата связано с повышением частоты дигенно- доминантных генотипов по генам *VRN-A1* и *VRN-B1* в комбинации с основным аллелем чувствительности к фотопериоду *Ppd-D1b*, тогда как для южных субтропических зон более характерны, наряду с озимыми формами, моногенно доминантные по *VRN-B1* (*VRN-D1*) генотипы, обеспечивающие более длительный вегетационный период.

Анализ структурной дивергенции *VRN-1* у первых тетраплоидных видов пшеницы и предполагаемых диплоидных доноров А- и В(Г)- геномов показал, что у первых тетраплоидов возникновение яровых форм связано с появлением новых доминантных аллелей *VRN-1*, не связанных по происхождению с доминантными аллелями диплоидных предшественников, причем набор аллелей у ветви *T. dicoccoides*, давшей начало культурным полиплоидам *T. durum* и *T. aestivum*, отличается от такового у тетраплоидов *Timopheevii*, что указывает на независимое происхождение яровых форм в составе этих ветвей аллополиплоидов пшеницы. У яровой пшеницы *T. timopheevii* возникновение данного признака связано, судя по всему, с инсерцией миниатюрного транспозона в 1-м интроне *VRN-A1* локуса, у *T. dicoccoides* яровые формы ассоциированы с делециями в промоторе (аллели *Vrn-A1b* и *Vrn-A1d*) и крупной делецией в первом интроне (аллель *Vrn-A1L*). Следует отметить, что в том и другом случае мутации затрагивали, главным образом, локус *VRN-A1*, тогда как другой гомеолог- *VRN-B1* (*G1*) у большинства яровых форм оставался без изменений (*T. dicoccoides*), либо мутации в нем не приводили к яровому фенотипу (*Timopheevii*; аллель *VRN-G1a*). В ходе дальнейшей эволюции аллополиплоидов, происходящих от *T. dicoccoides*, в результате искусственного отбора, произошло распространение доминантных аллелей по другим гомеологичным локусам (*VRN-B1*, *VRN-D1*) и их комбинаций с аллелями *VRN-A1*, оптимальных для тех или иных климатических условий.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Роль мобильных элементов класса LTR- ретротранспозонов в эволюции полиплоидных геномов злаков

LTR ретротранспозоны являются наиболее распространенным и гетерогенным классом ПП ДНК у высших растений (Flavell et al., 1992; Bennetzen, 1996; Kumar and Bennetzen, 1999; Vicient et al., 2001; Vitte and Panaud, 2005; Sabot and Schulman, 2006). Одной из целей данной работы являлось изучение механизмов реорганизации этого класса последовательностей в ходе эволюции различных полиплоидных представителей злаков, включая пшеницу и рис. Удобной моделью для выяснения роли отдельных компонентов генома в процессе аллополиплоидизации является комплекс *O. officinalis* риса, включающий как разнообразные диплоидные виды с высоко дивергированными геномами, так и аллополиплоиды, объединяющие субгеномы различного происхождения. До настоящей работы для анализа взаимоотношений между различными диплоидными и полиплоидными видами *Oryza* использовались повторяющиеся последовательности ДНК, относящиеся к различным классам: тандемные, гены рРНК, мини- и микросателлиты, мобильные элементы (Zhao et al., 1989; Cordesse et al., 1992; Uozu et al., 1997; Iwamoto et al., 1998; Kumekawa et al., 1999). В большинстве своем эти последовательности выделены из АА- генома, к которому принадлежит культурный рис и его дикие предшественники. Из генома *O. officinalis* ранее были выделены два крупных семейства: тандемный повтор TrsC и ретротранспозон *RIRE-1* (Nakajima et al., 1996). Первый повтор является специфичным для СС- генома, к которому принадлежат диплоидные виды *O. officinalis*, *O. eichingeri* and *O. rhizomatis*, тогда как *RIRE-2* распространен в диплоидном геноме *O. australiensis*- единственном представителе ЕЕ- генома.

4.1.1. Изучение дивергенции распространенного ретроэлемента у ди- и полиплоидных представителей комплекса *O. officinalis*

На первом этапе нами проведено выделение из геномов комплекса *O. officinalis* наиболее распространенных ПП ДНК. С этой целью были созданы геномные библиотеки из тотальной ДНК диплоидных видов, представляющих СС-, ВВ- и ЕЕ- геномы данного комплекса (Табл. 1 приложения). Далее, из полученных библиотек были отобраны клонированные ПП, дающие наиболее интенсивный сигнал гибридизации с тотальной ДНК того же вида. В дальнейшем проведен анализ структуры и геномной организации отобранных клонов. Ни одна из отобранных клонированных последовательностей не являлась специфичной для какого-либо одного вида анализируемого комплекса. Последовательность *pOe 49*, выделенная из *O. eichingeri* (СС- геном), давала сильный перекрестный сигнал гибридизации с ДНК всех остальных видов, что указывало на ее широкую распространенность и пригодность в качестве молекулярного маркера комплекса *O. officinalis* в целом.

Количественная оценка *pOe 49* подтвердила ее высокое содержание (порядка 10^5 копий на гаплоидный геном) внутри каждого из диплоидных видов комплекса. Поиск в базах данных с использованием транслированной версии последовательности выявил ее сходство с участком интегразного домена *gypsy*- подобных LTR ретротранспозонов (Рис. 20). Известно, что данный класс LTR ретротранспозонов высоко распространен в геномах растений, в частности, у риса, наряду с *copia*- подобными ретротранспозонами (Nakajima et al. 1996; Noma et al. 1997; Suoniemi et al. 1998; Kumekawa et al. 1999).

Последовательность *pOe 49* была использована в качестве RFLP- пробы для оценки ее структурной дивергенции у видов комплекса *O. officinalis* (Рис. 21). По результатам Саузерн- гибридизации можно сделать вывод о том, что степень дивергенции этой последовательности коррелирует с генетическим расстоянием между образцами видов так, что можно

идентифицировать не только различные виды (геномы), но даже различные эколого-географические расы отдельных видов. На основании данных RFLP- анализа была проведена оценка внутри- и межвидовых генетических расстояний (Табл. 6) и построена дендрограмма (Рис. 22). Полученные результаты хорошо согласуются с существующими представлениями о филогенетических взаимоотношениях внутри изученного комплекса (Vaughan 1994). Следует сказать, что эволюция ретротранспозонов отдельных классов или семейств не всегда отражает эволюцию вида-хозяина, особенно в случае молодых, активных семейств (Xiong & Eickbush 1990; Voytas et al. 1992; Capu et al. 1994; Bennetzen 2000). Однако, в основной массе ретроэлементы в геноме представлены неактивными копиями и их дивергенция подчиняется закону нейтральной эволюции, который обуславливает корреляцию структурных изменений с филогенетическим расстоянием (Waugh et al. 1997; SanMiguel et al. 1998; Kumekawa et al. 1999). Полученные нами результаты подтверждают возможность использования LTR ретроэлементов класса *gypsy* для оценки филогенетических взаимоотношений между видами. Это касается и взаимоотношений аллополиплоидных видов с диплоидными видами-предшественниками. Так, полиплоидный вид *O. punctata* (ВВСС) из Африки имеет наименьшее генетическое расстояние от образцов диплоидных видов *O. punctata* (ВВ) и *O. eichingeri* (СС), произрастающих на той же территории и являющихся предполагаемыми донорами субгеномов для данного полиплоидного вида (0.3778 и 0.3963, соответственно; Табл. 6). Следует обратить внимание на большое сходство между полиплоидным *O. punctata* и остальными видами с ВВСС-геномом (*O. minuta* и *O. officinalis*), распространенными в Индии и Юго-Восточной Азии (Табл. 6; Рис. 22). В сравнении с африканским тетраплоидом последние виды более удалены от диплоидного *O. punctata*, и примерно одинаково удалены от С-геном- содержащих диплоидных видов азиатского и африканского происхождения, что не позволяет точно идентифицировать близкого диплоидного донора С-генома для этих видов

по данным RFLP-анализа. Что касается южно-американской группы CCDD аллотетраплоидов, то эта группа изолирована от остальных видов комплекса и сильно отличается по разным признакам от других представителей комплекса *O. officinalis* (Jena and Kochert 1991; Aggarwal et al. 1996), что подтверждается нашими результатами (Табл. 6; Рис. 22). В настоящее время возможные диплоидные предшественники этой группы не обнаружены.

В ранних работах по исследованию ретроэлементов в геномах растений проводилось выделение с помощью ПЦР отдельных консервативных доменов, таких как домен обратной транскриптазы (RT) или интегразы (INT или ICD), и анализ их первичной структуры (Flavell et al. 1992; Voytas et al. 1992; Gribbon et al. 1999). Нами были сконструированы специфические праймеры для амплификации участка в составе INT домена *gypsy*-ретротранспозона, содержащего клонированную последовательность *pOe 49* (Рис. 23). Данные праймеры позволили амплифицировать фрагменты длиной ~ 300-350 пн у всех взятых для исследования образцов комплекса *O. officinalis*. Гетерогенный набор ПЦР-продуктов каждого образца был клонирован и затем по результату блот-гибридизации с *pOe 49* были отобраны клоны, дающие наиболее сильный сигнал гибридизации, для дальнейшего секвенирования.

Секвенированные нуклеотидные последовательности образцов были транслированы в аминокислотные и проведен их сравнительный анализ. Анализ выявил ряд коротких участков (блоков), ранее идентифицированных как консервативные (Kulkosky et al. 1992), в частности, C-2-C мотив, присутствующий у подавляющего большинства проанализированных последовательностей (Рис. 23). Противоположный от данного мотива конец INT последовательностей является более вариабельным и, в зависимости от его структуры, могут быть выделены два субсемейства. Последовательности INT1 являются полноразмерными и содержат D-60-D-35-E (DDE) мотив, существенный для функции белка интегразы (Kulkosky et al. 1992; Suoniemi et al. 1998). У укороченных последовательностей INT2 произошла делеция,

в результате которой остаток глутаминовой кислоты (E) из указанного мотива находится в позиции, примерно соответствующей второму остатку аспарагиновой кислоты (D) в том же мотиве. Следовательно, можно предполагать, что INT2 последовательности кодируют нефункциональный белок интегразы и могли получить распространение у некоторых видов в составе соответствующего ретроэлемента, благодаря активности функционального белка *in trans*. Поиск гомологии в базах данных с помощью алгоритма BLAST выявил значительную гомологию аминокислотных INT последовательностей с соответствующими последовательностями ретротранспозона *RIRE-2*, который, наряду с другими *gypsy*-подобными элементами (*RIRE-3* и *RIRE-8*), был выделен из культурного риса *O. sativa* (Kumekawa et al. 1999; Ohtsubo et al. 1999).

В предыдущих работах были попытки оценить межвидовые взаимоотношения в составе комплекса культурного риса *O. sativa* с использованием некоторых генов и коротких повторяющихся последовательностей (Barbier et al. 1991; Motohashi et al. 1997; Iwamoto et al. 1998; Iwamoto et al. 1999). Нами для анализа малоизученного комплекса видов *O. officinalis* была использована часть кодирующей последовательности ретротранспозона, которая, как было показано предварительно, является эффективным RFLP-маркером. На дендрограмме данного комплекса, построенной с использованием последовательностей INT выделяются три основных кластера, соответствующие основным географическим районам распространения видов *O. officinalis*: Азия, Африка и Южная Америка (Рис. 24). В целом, между указанной дендрограммой и дендрограммой на основе RFLP-анализа (Рис. 22) имеется хорошее соответствие, в особенности, в части кластеризации южно-американских тетраплоидных видов (CCDD). Тетраплоидный *O. punctata* (BBCC) из Африки кластеризуется с диплоидными *O. eichingeri* (CC) и *O. punctata* (BB), происходящими из того же региона, а также с тетраплоидом *O. malampuzhaensis* (син. *O. officinalis*) (BBCC) из Индии. Возможно С- геном последнего вида имеет не азиатское

(от диплоидного *O. officinalis*), а африканское происхождение - от соответствующей формы *O. eichingeri*. В отличие от RFLP- дендрограммы, в этом кластере отсутствует третий ВВСС-тетраплоид - *O. minuta*, распространенный в Юго-Восточной Азии (Филиппины). Он объединяется вместе с азиатскими диплоидными видами, содержащими С-геном, и наиболее близок к форме *O. officinalis* из Китая, с которой он также близок географически (Рис. 24).

Таким образом, данные RFLP-анализа и анализа первичной структуры INT домена ретроэлемента *gypsy* у видов комплекса *Officinalis* свидетельствуют о том, что различные субсемейства ретроэлемента подвергались независимой амплификации в ходе расхождения диплоидных видов комплекса и, в дальнейшем, при образовании и последующей эволюции аллополиплоидных форм эти субсемейства, в целом, сохранили свою структурную организацию в рамках отдельных субгеномов. Это дает возможность использовать последовательности ретротранспозонов в качестве маркеров различных видов, а также для изучения происхождения полиплоидных видов.

4.1.2 Организация и эволюция геном-специфических LTR ретро-элементов в составе полиплоидных форм пшеницы

Изучение различных компонентов генома на молекулярном уровне проходило ряд этапов, в зависимости от развития технологий. На первом этапе, который продемонстрирован в предыдущей главе, выделялись короткие последовательности ДНК, в дальнейшем используемые для секвенирования или/и в качестве зондов для анализа спектров рестрикции и ПЦР-спектров, а также для гибридизации *in situ*. С появлением методов клонирования в бактериальных векторах (ВАС- клонирование) и высоко-производительного (массового) секвенирования появилась возможность проводить исследование протяженных участков генома размером свыше 100 тпн, строить физические карты хромосом и, в конечном итоге, получать

нуклеотидные последовательности отдельных хромосом и генома в целом (Brenchley et al., 2012; <http://www.wheatgenome.org>). По аналогии с библиотеками коротких последовательностей, были созданы ВАС-библиотеки протяженных фрагментов геномной ДНК, которые используются для анализа макроорганизации генетических локусов, в которых объединены различные компоненты: ПП ДНК, в том числе, МЭ, уникальные гены и тд.

Предыдущий анализ структурной организации мобильного элемента класса LTR ретротранспозонов в геноме риса показал, что при переходе на полиплоидный уровень организации генома сохраняются структурные особенности ретроэлементов, сформированные на уровне диплоидных геномов-предшественников и позволяющие идентифицировать отдельные субгеномы по RFLP-профилям ретроэлемента, или же по его первичной нуклеотидной (или аминокислотной) последовательности. В этой связи представляет интерес: сохраняется ли данная особенность эволюции ретро-транспозонов у более сложно организованных полиплоидов, как, например, у гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*, размер генома которой в 40 раз превышает размер генома риса.

Ранее мы провели скрининг ВАС-клонотеки *T. aestivum* сорта “Renan”, чтобы отобрать ВАС-клоны, содержащие субтеломерные повторы (Salina et al. 2009). Среди отобранных клонов выявлены два, имеющие дисперсный сигнал гибридизации с хромосомами *T. aestivum*. При этом в обоих случаях гибридизация затрагивала только один из трех геномов. Анализ первичной структуры ВАС-клона 2383A24, специфичного для В-генома, показал, что подобная специфичность обусловлена присутствием *Ty3-gypsy*-ретротранспозона *Fatima* (Salina et al. 2011). В состав ВАС_2383A24 (113 605 пн) входят мобильные элементы (55.6%), субтеломерный тандемный повтор *Spelt 1* (0.9%) и пять генов (Рис. 52). LTR-ретротранспозоны являются доминантным классом, составляя 50.7% общей длины ВАС-клона. Из них 47.2% приходится на три элемента класса *gypsy*-LTR-ретротранспозонов,

относящихся к семейству *Fatima*. FISH с использованием субклона *Fatima_2383A24-3* подтвердила, что именно элементы данного семейства отвечают за В-геном- специфичный паттерн гибридизации ВАС_2383A24.

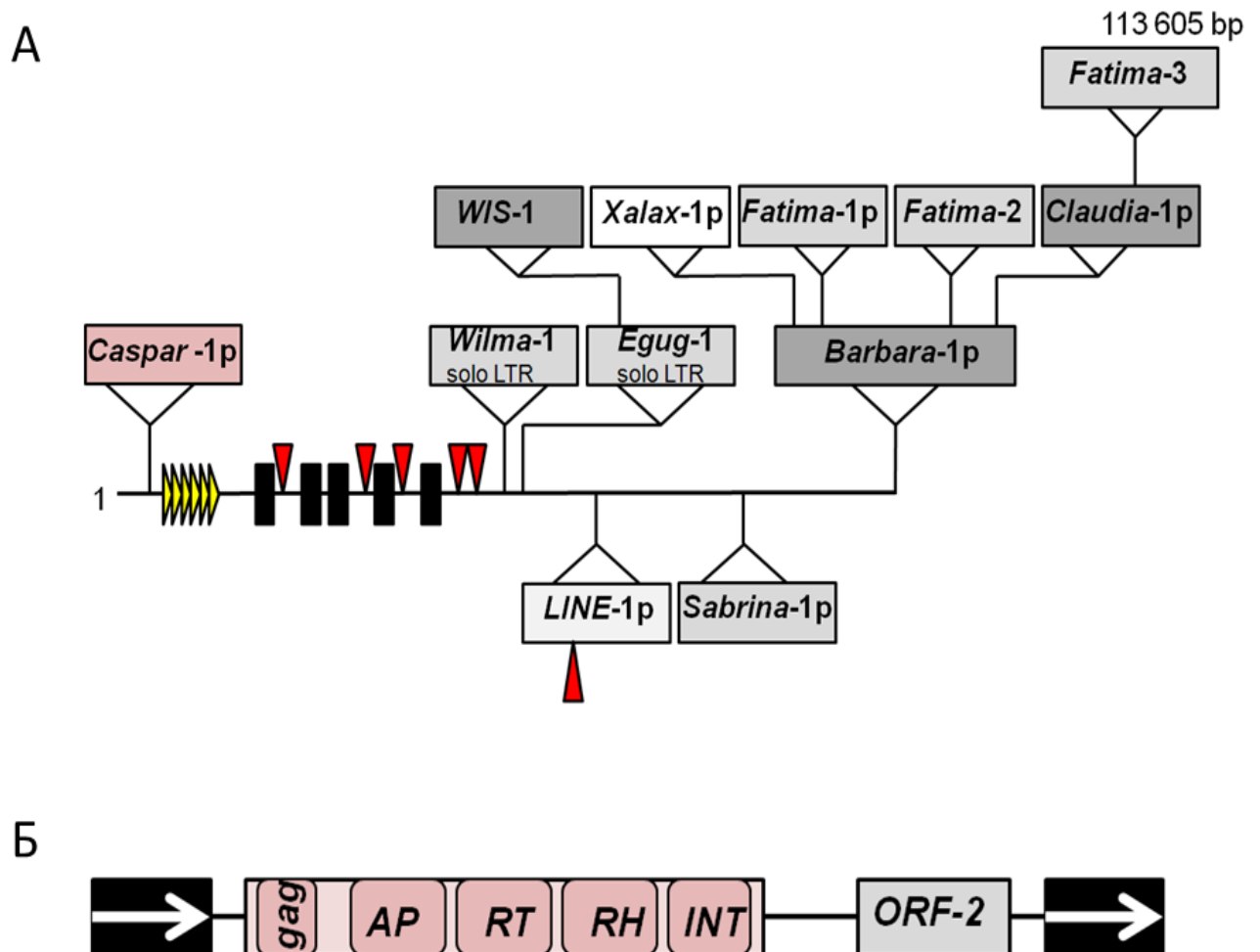


Рис. 52 А- схема ВАС- клона 2383A24. Красные треугольники обозначают локализацию минитранспозонов МІТЕ, желтые- тандемный повтор Spelt1, черные прямоугольники- гены, серые прямоугольники- LTR ретротранспозоны (*coria* и *gypsy*) (“р” в названиях обозначает укороченный элемент). Розовый прямоугольник-ДНК транспозон. Б- схема автономного элемента *Fatima_2383A24-3* (*Fatima-3*) (Salina et al. 2011).

Филогенетический анализ различных *Fatima*-элементов, доступных в базах данных, а также оценка времени их инсерции показали дивергенцию этих элементов на 3 основные группы (Рис. 53). Одна из этих групп, содержащая *Fatima_2383A24-3* является специфичной для В-генома и амплифицировалась примерно 0.5-2.5 млн. лет назад.

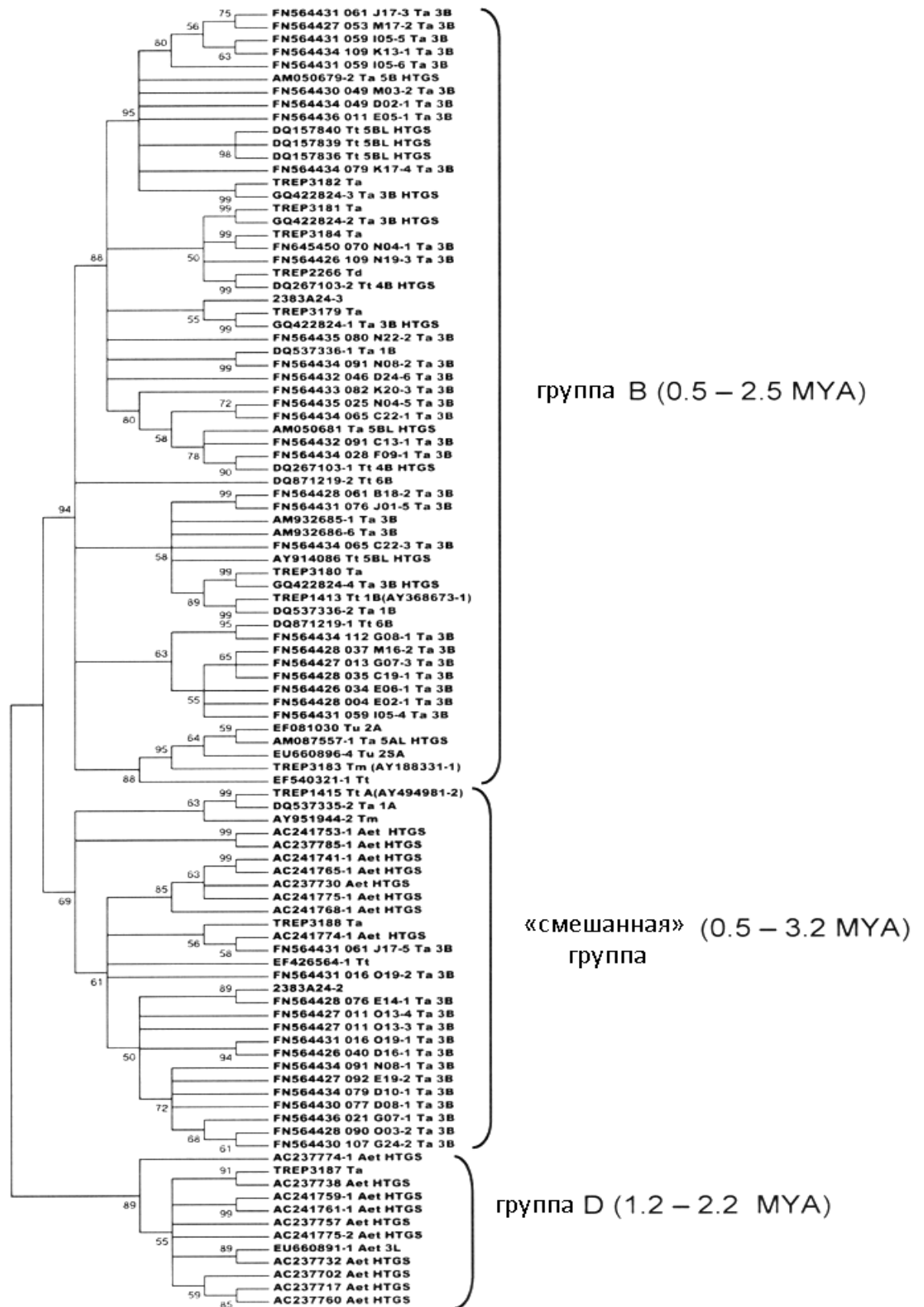


Рис. 53 Филогенетическое NJ (Neighbor-joining)- древо автономных *Fatima* элементов из различных геномов Triticeae. Обозначены бутстреп-значения выше 50%. В скобках указано время инсерции для каждой группы (Salina et al. 2011).

В настоящей работе проанализирован другой ВАС-клон - 112D20 (Щербань и др. 2012). С помощью FISH установлена его преимущественная локализация на хромосомах D-генома (Рис. 25а). Результаты ВАС-FISH с диплоидными видами- предшественниками А-, В- и D-геномов позволяют отчетливо идентифицировать хромосомы *Ae. tauschii* (DD) на фоне двух других видов. Анализ полной первичной структуры ВАС-клона 112D20 позволил предположить, что его специфичность для D-генома определяется *Ty3-gypsy*- ретротранспозоном, входящим в малоизученное семейство *Lila* (Рис. 26). Наряду с гомологичной последовательностью AF488415.1 из генома *T. monococtum*, в базе данных TREP найдено несколько элементов из генома *T. aestivum*, сходных по структуре с описанным нами *Lila* 112D20-1. Максимальную гомологию проявляет LTR, а также 5'-кодирующая область (80-85%). Однако малое количество гомологичных *Lila* последовательностей не позволяет провести достоверный анализ их дивергенции, как это сделано в случае элемента *Fatima* (см. выше). FISH-гибридизация с использованием в качестве зонда различных участков ретротранспозона *Lila* 112D20 подтвердила его специфичность для D-генома и показала, что эти участки дивергировали с разной скоростью. Наибольшей специфичностью для D-генома обладает последовательность, расположенная в 3'-кодирующей области (RT-домен) (Рис. 25б). Аналогичную особенность наблюдали и при изучении *Ty1-copia*-ретротранспозонов *Ae. speltoides* (Raskina et al. 2002). Использование в качестве зонда RT-домена этих элементов позволило более эффективно идентифицировать хромосомы В-генома.

Существует метод поиска маркеров генетических локусов, основанный на подборе праймеров, специфичных к сайтам встраивания МЭ, и последующем анализе растительного материала с помощью ПЦР (ISBP-маркеры) (Paux et al. 2006). Мы использовали этот подход для более точной хромосомной локализации ВАС-клона 112D20 и определения приблизительного времени инсерции ретротранспозона *Lila* 112D20-1. С использованием праймеров к районам J1 и J2, фланкирующим этот

ретротранспозон, проведен ПЦР-анализ различных видов Triticeae (Рис. 27). По результатам этого анализа видно, что инсерция ретротранспозона произошла внутри предкового вида *Ae. tauschii*. Ранее была разработана формула расчета времени инсерции ретротранспозона по степени гомологии его LTR, основанная на линейном характере их взаимной дивергенции во времени: $T = D/2t$, где T - время инсерции; D - оценка дивергенции LTR; t - количество замен на нуклеотидный сайт в год (SanMiguel et al 1998). Степень дивергенции LTR оценивали по методу Кимуры (Kimura 1980), в качестве t использовали значение 1.3×10^{-8} (Ma and Bennetzen 2004). С помощью этой формулы мы получили ориентировочное время встраивания - 1.7 млн лет. Эта цифра близка к верхней границе периода появления дикой тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides*- 2.5 млн лет назад (Feldman et al. 1995; Blake et al. 1999; Huang et al. 2002). Интересно, что инсерция В-специфичного ретротранспозона *Fatima* в ВАС-клоне 2383A24 произошла примерно в то же время (1.6 млн лет), что и инсерция *Lila* 112D20-1 (Salina et al. 2011). На основании филогенетического анализа последовательностей *Fatima* был сделан вывод, что амплификация В-специфичного варианта *Fatima* произошла до формирования тетраплоидной пшеницы (ВВАА), в составе донора В-генома- предкового вида *Ae. speltoides*. По-видимому, геном-специфичные элементы у диплоидных видов Triticeae формировались на протяжении периода времени после их дивергенции от общего предка. Тот факт, что 80% МЭ в составе А- и В-геномов амплифицировались до формирования аллополиплоидных пшениц, также подтверждает эту гипотезу (Charles et al. 2008).

В изученном нами ВАС-клоне 112D20 МЭ занимают 98.5% нуклеотидной последовательности, тогда как на долю генов и неидентифицированных участков приходится 1.5% (Табл. 7). Среди МЭ преобладают LTR-ретротранспозоны, а именно, *Tu3-gypsy*-подобные элементы (61.7%). Найдена только одна ОРС, не относящаяся к кодирующим последовательностям МЭ (Рис. 26). Кодируемая этой ОРС аминокислотная

последовательность на 49% гомологична продукту неизвестного гена, который находится на расстоянии 6 т.п.н. от гена *Lr21* (AF532104). Нельзя исключить, что указанная ОРС имеет отношение к функционированию ретроэлемента *Fatima*, поскольку в составе ВАС-клона 112D20 она непосредственно ограничена этим элементом. Отсутствие значимых генов не позволяет установить точную локализацию ВАС-клона 112D20 по синтении с другими геномами. С помощью ПЦР мы определили его приблизительную локализацию в пределах дистальной четверти длинного плеча хромосомы 5D (Щербань и др. 2012). В составе ВАС-клона 112D20 не найден субтеломерный повтор *Spelt 52*, несмотря на то что ранее его выявили с помощью ПЦР (Salina et al. 2009). Вероятно, положительный результат ПЦР был обусловлен случайной реассоциацией праймеров с короткими последовательностями, и принадлежность ВАС-клона 112D20 к субтеломерному району остается невыясненной.

В целом, изученный ВАС-клон 112D20- это генетически инертный участок генома с высокой концентрацией МЭ, образующих структуры типа “вложенных инсерций” (nested structure). Сопоставив данные FISH, первичную структуру ВАС-клона, а также результаты ПЦР-анализа различных видов *Triticaceae*, мы сделали вывод, что наблюдаемая картина гибридизации ВАС-клона 112D20 обусловлена присутствием *Ty3-gypsy*-ретротранспозона *Lila*, специфичного для D-генома. Этот ретроэлемент подвергся значительной амплификации внутри диплоидного вида- предка D-генома.

Таким образом, нами впервые показано, что в дифференциации В- и D-геномов мягкой пшеницы существенную роль играли процессы амплификации LTR-ретротранспозонов, относящихся к двум семействам: *Fatima* и *Lila* (Рис. 54). Пролиферация этих ретроэлементов происходила ок. 2 млн. лет назад, что соответствует времени формирования диплоидных предшественников мягкой пшеницы.

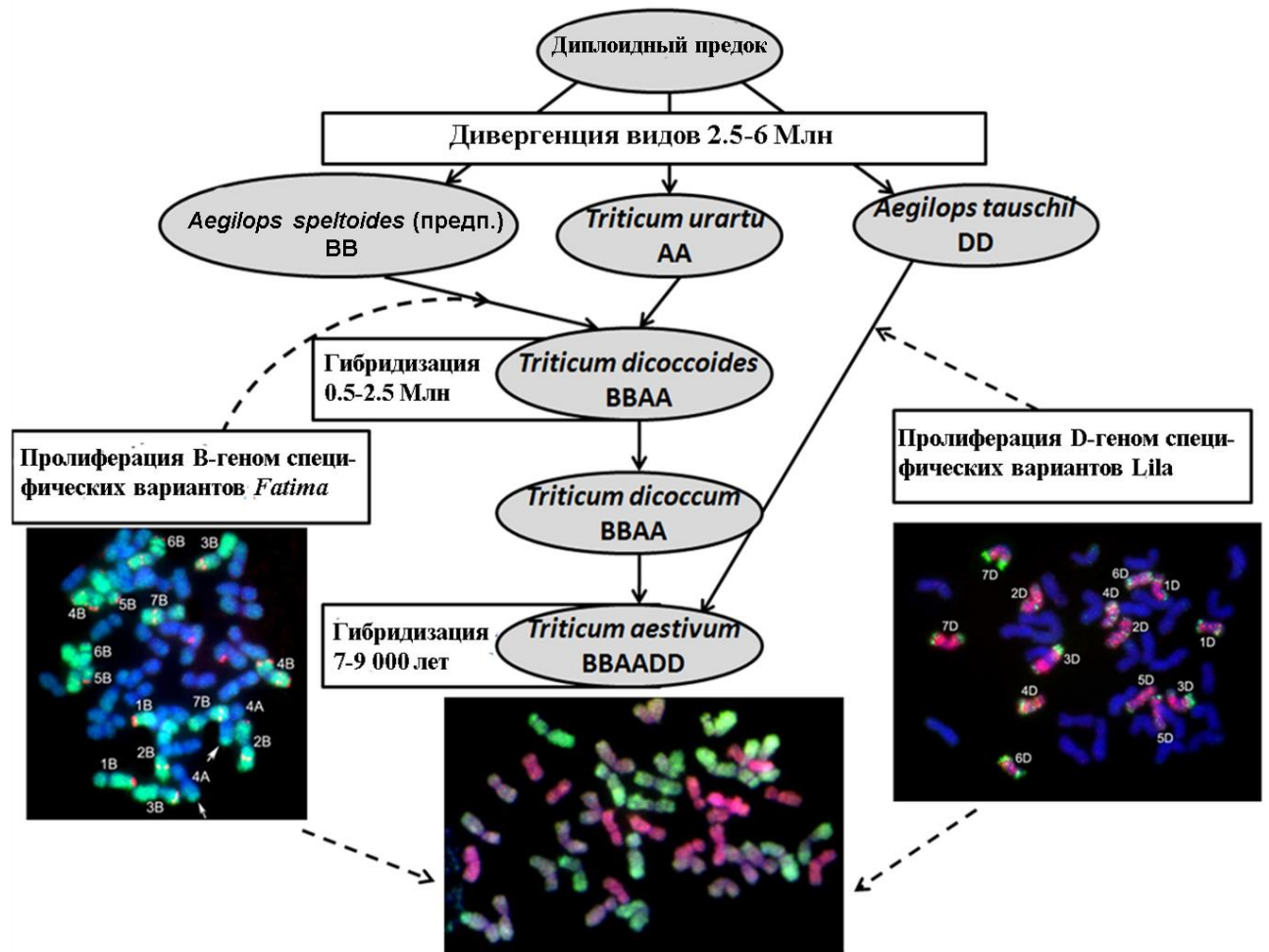


Рис. 54 Схема пролиферации геном- специфических LTR ретротранспозонов в геномах диплоидных предшественников полиплоидных пшениц. Внизу-картины FISH для BAC_2383A24 (зеленое свечение) и BAC_112D20 (красное свечение) с хромосомами *T. aestivum*, сорт “Chinese Spring”.

Полученные нами данные, подтверждают единый для каждого из трех геномов гексаплоидной пшеницы сценарий формирования геном-специфичных мобильных элементов в составе диплоидных видов-предшественников. Основной особенностью эволюции LTR ретротранспозонов при переходе на полиплоидный уровень, выявленной также у риса (см. гл. 4.1.1), является сохранение специфической локализации и структурной организации внутри субгеномов, что позволяет использовать последовательности этих мобильных элементов в качестве молекулярных маркеров отдельных субгеномов у полиплоидных видов. Существует гипотеза, что такая организация МЭ создает специфический «ландшафт»

внутри каждого субгенома, обеспечивая дифференцированное состояние гомеологичных хромосом, что, в свою очередь, препятствует их спариванию в ходе мейоза (Levy and Feldman 2002). Можно также предположить, что время, прошедшее с момента образования полиплоидных форм недостаточно для столь массового обмена и перегруппирования МЭ между гомеологичными хромосомами. В то же время, существуют примеры быстрой реорганизации МЭ у аллополиплоидов растений. Так, например, у аллополиплоидов рода *Nicotiana*, образовавшихся около 1 млн лет назад, произошел существенный обмен МЭ между субгеномами (Lim et al., 2007). По видимому, в каждом аллополиплоиде работают разнонаправленные механизмы активации и супрессии МЭ и их суммарный вектор индивидуален для каждого конкретного аллополиплоида, в зависимости от множества внутренних и внешних факторов, значение которых еще предстоит выяснить.

4.2. Ранние геномные изменения у искусственных амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops*

4.2.1. Локальные геномные изменения в составе синтетического аллополиплоида *Ae. longissima* x *T. urartu*

На модели синтетического аллополиплоида *Ae. longissima* x *T. urartu* (TL05 x TMU06) нами была предпринята попытка оценить масштаб изменений субтеломерных, микросателлитных и случайно амплифицируемых последовательностей геномной ДНК на ранней стадии аллополиплоидизации.

Ранее, при изучении синтетических аллополиплоидов, полученных при скрещивании видов родов *Triticum* и *Aegilops* были выявлены изменения числа копий субтеломерных повторяющихся последовательностей, в частности, преимущественная делеция повтора Spelt 1 и амплификация повтора Spelt 52 (Salina et al. 2004). Эти данные легли в основу более детального анализа изменений в районах локализации различного типа

субтеломерных повторов. Для этой цели были отобраны 11 праймеров к пяти повторам: теломерному (Tel 1), субтеломерным повторам Spelt 1 и Spelt 52, характерным для видов *Aegilops* и *Triticum*, а также субтеломерным тандемным повторам, специфичным для геномов риса - Trs A, Trs B (Salina et al. 2004). Праймеры были подобраны таким образом, чтобы амплифицировать промежуточные последовательности между различными повторами, находящимися в той или иной ориентации друг к другу. ПЦР анализ аллополиплоида TL05 x TMU06 и его родителей с использованием 66 парных комбинаций праймеров к теломерной/ субтеломерной ДНК позволил обнаружить только один случай полиморфизма, а именно отсутствие продукта амплификации *T. urartu* длиной около 500 пн (Tel-Sp52R-500) в ПЦР-спектре гибрида. Секвенирование данного фрагмента не выявило гомологии с повторами Tel и Spelt 52, однако, была выявлена частичная гомология с генами, кодирующими предполагаемые транскрипционные факторы регуляции цветения и эмбрионального развития (SEUSS- подобные факторы) (Bao et al. 2010).

Возможны различные объяснения отсутствия фрагмента Tel-Sp52R-500 у аллополиплоида TL05 x TMU06. Например, при образовании аллополиплоида могли произойти изменения (мутации, микроинсерции или микроделеции) в местах отжига праймеров. Нельзя также исключить и вероятность делеции более протяженной последовательности ДНК, в состав которой входит Tel-Sp52R-500. Кроме того, наблюдаемые изменения в спектре ПЦР могла вызвать инсерция транспозона внутри данной последовательности.

Мы также использовали RAPD-подход для поиска возможных генетических изменений у амфиплоида TL05 x TMU06. Данный подход позволяет провести предварительный экспресс-скрининг полиморфизмов геномной ДНК, используя универсальный набор праймеров. Отсутствие ряда ПЦР-фрагментов, характерных для генома родителей, в RAPD-спектрах аллополиплоида TL05 x TMU06 было показано при использовании

13 праймеров из 38 (34%). Относительно большое количество выявляемых с помощью RAPD геномных изменений может быть связано с высокой чувствительностью данного метода к точечным мутациям в сайтах отжига праймеров (Penner 1996). Эти мутации в случае стандартных праймеров длиной 20-22 пн, за исключением последнего нуклеотида на 3'-конце, не так существенно влияют на процесс амплификации ДНК. Результаты анализа последовательности R068-TL05-600 также указывают на то, что RAPD-изменения, выявленные у аллополиплоида, связаны с точечной мутацией в последовательности СААСТАGACGG (праймер R068) (Рис. 30). Интересно, что в данной последовательности обнаружены точечные мутации и у отдаленных гибридов *H. vulgare* x *T. aestivum* (Бильданова и др. 2002). Мутации в данном районе ДНК происходят и под воздействием факторов внешней среды, приводя к межпопуляционному полиморфизму. Так, специфические продукты амплификации, гомологичные R068-TL05-600, были обнаружены только у 3-х образцов *Ae. longissima* (TL03, TL05, TL15), собранных в разных районах Израиля, и отсутствовали у 2-х других образцов данного вида и у других близкородственных видов. Таким образом, наблюдается определенное сходство геномных изменений под воздействием различных факторов. Или, другими словами, существует независимая от характера воздействия избирательность выбора последовательностей ДНК в качестве мишеней для геномных изменений. Пока неизвестно: в чем состоит причина такой избирательности- в специфической структуре (конформации) последовательности ДНК, наиболее подверженной различным мутациям, ее локализацией в, так называемых, «горячих точках» мутагенеза, или же какими-то функциональными особенностями, связанными, к примеру, с регуляцией генов ответа на стресс?

Стрессовые факторы увеличивают и скорость мутаций в микросателлитных последовательностях ДНК. Считается, что уровень мутации микросателлитных локусов различен и находится в интервале от 10^{-6} вплоть до 10^{-2} (Schlotterer 2000). В условиях стресса эта величина может

значительно увеличиваться. Так, например, в условиях культивирования *in vitro* для отдельных видов растений можно выявить изменение длины одного из 10 SSR локусов в среднем у каждого регенеранта (Rahman and Rajora 2001). В данной работе нами было изучено 23 микросателлитных локуса у амфиплоида TL05 x TMU06 первого поколения, полученного путем колхицинирования гибрида F₁. Ни для одного изученного SSR- локуса не было обнаружено изменений в длине микросателлита. Аналогичными были результаты анализа 34 SSR- локусов у 14 тетра- и гексаплоидов, полученных с участием *Ae. tauschii* (геном DD) в качестве одного из родителей (Песцова Е.Г., Рёдер М., данные не опубликованы). Надо отметить, что и условия культивирования *in vitro* гексаплоидной пшеницы не приводили к изменению длины у 104 изученных микросателлитов (Добровольская 2003). По всей видимости, микросателлитные локусы полиплоидных видов злаков отличаются высокой стабильностью по отношению к стрессовым факторам.

Таким образом, изучение геномной ДНК у амфиплоида *Ae. longissima* x *T. urartu* с использованием различных методик ПЦР- анализа: 1) не выявило каких либо значительных изменений в последовательностях, находящихся на стыках различных семейств теломерных и субтеломерных повторов. В сочетании с данными о количественных изменениях в составе некоторых семейств субтеломерных повторов на ранних стадиях амфиплоидизации (Salina et al. 2004), это указывает на то, что такие изменения вероятно имеют локальный характер (в пределах данных семейств) и не затрагивают близлежащие районы, в особенности, районы теломерных повторов, выполняющих важную защитную функцию для концов хромосом и определяющих число репликационных циклов клетки (предел Хейфлика) (Shay and Wright 2000). 2) Не были обнаружены изменения и в участках генома, ограниченных микросателлитными тандемными повторами, вариация которых довольно часто сопровождает процессы геномной реорганизации под действием тех или иных стрессовых факторов. 3) Случайно амплифицируемые последовательности оказались единственными

маркерами геномных изменений в составе изученного амфиплоида, однако, значительная часть этих изменений, по видимому, представляет точечные мутации в сайтах отжига праймеров. В целом, полученные результаты указывают на консервативную организацию изученных фракций геномной ДНК на ранних стадиях аллополиплоидизации.

4.2.2. Изменения генов 45S и 5S рРНК в составе синтетических амфиплоидов шеницы

4.2.2.1. Супрессия NOR *Ae. sharonensis* у амфиплоида *Ae. umbellulata* x *Ae. sharonensis*

Ранее, Бадаевой Е.Д. (ИОГен, Москва) было проведено окрашивание серебром препаратов хромосом синтезированного амфиплоида *Ae. sharonensis* TH01 x *Ae. umbellulata* TU04 и его диплоидных родителей для определения ядрышковой активности- экспрессии генов 45S рРНК. Число активных ядрышковых организаторов подсчитывалось в клетках корня на стадиях интерфазы и метафазы. У диплоидных *Ae. umbellulata* и *Ae. sharonensis* это число варьировало от 1 до 4, в среднем- 1.62 и 1.68, соответственно (Табл. 12), что согласуется с более ранними наблюдениями (Cermeno et al., 1984). На метафазных пластинках были видны 2 пары хромосом с окрашенными серебром участками NOR (Ag-NORs) у обоих диплоидных видов (Рис. 55). Размер Ag-NOR на хромосоме 1U:2U *Ae. umbellulata* был гораздо больше, чем на хромосоме 5U, а хромосома 6S^{sh} *Ae. sharonensis* содержала более крупный Ag-NOR в сравнении с хромосомой 5S^{sh}.

У амфиплоида TH01 x TU04 число ядрышек в интерфазных ядрах варьировало от 1 до 4, в среднем- 2.09, что выше средних значений каждого из родителей, но гораздо меньше ожидаемой суммы (Табл. 12). 4 NOR-содержащие хромосомы были выявлены во всех наблюдаемых метафазных ядрах (Рис. 55). Основываясь на морфологии хромосом и данных FISH с хромосом-специфичными зондами, наиболее крупные Ag-NOR содержала

пара 1U:2U хромосом, а Ag-NOR меньшего размера находился на паре 5U хромосом. Отсутствие Ag-NOR на двух других парах хромосом у амфиплоида убедительно доказывает супрессию ядрышковых организаторов S^{sh} субгенома в ответ на аллополиплоидизацию (ядрышковое доминирование).

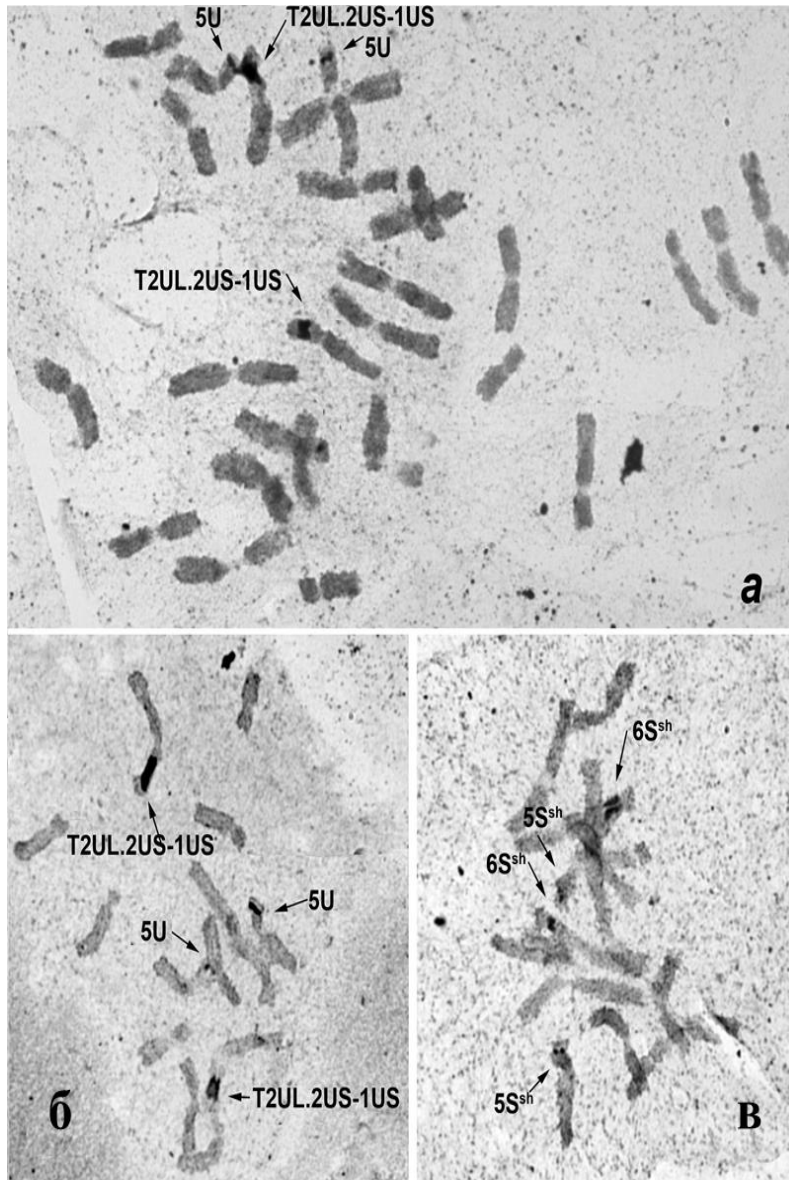


Рис. 55 Окрашенные серебром метафазные пластинки: (а) амфи-плоид TH01xTU04, (б) *Ae.umbellulata* (TU04), (с) *Ae. sharonensis* (TH01). Окрашенные серебром ядрышко-образующие районы отмечены стрелками (данные Е.Д. Бадаевой).

Табл. 12 Ядрышко-образующие районы (Ag-NORs) и число ядрышек в метафазных и интерфазных клетках *Ae. umbellulata*, *Ae. sharonensis* и амфиплоида TH01 x TU04 (данные Е.Д. Бадаевой).

Образцы	Число	Число ядрышек	Число ядрышко-образующих
---------	-------	---------------	--------------------------

	клеток						хромосом	
		1	2	3	4	среднее	ожд.	факт.
<i>Aegilops umbellulata</i> (TU04)	200	102	76	19	3	1.62	4	4
<i>Aegilops sharonensis</i> (TH01)	231	103	104	18	6	1.68	4	4
TH01 x TU04	216	57	99	43	17	2.09	8	4

Martini et al. (1982) предположили, что доминантный эффект NOR U-субгенома обусловлен большим количеством повторов в составе межгенного спейсера (ETS: external transcribed spacer), по сравнению с другими видами *Triticum*. Reeder et al (1985) предложили гипотезу «дисбаланса энхансеров» для объяснения ядрышкового доминирования, согласно которой в условиях лимитирующей концентрации энхансерных белков единицы рДНК с большим количеством повторов связывают большее количество этих белков. Клонирование и секвенирование рДНК *Ae. umbellulata* выявило вставку 130 пн внутри ETS, которая отсутствует у *Ae. sharonensis* (Kulikov and Vakhitov 1995). Данная инсерция, по видимому, возникла в ходе дивергенции *Ae. umbellulata*, поскольку она не выявлена у других исследованных видов *Triticeae*. Вставка содержит короткую последовательность 26 пн, повторенную 6 раз у *Ae. umbellulata*, тогда как у других видов *Aegilops* имеется только одна копия. Возможно эти повторы в составе инсерции служат в качестве транскрипционных энхансеров, которые обуславливают более высокую активность NOR *Ae. umbellulata* в различных гибридных комбинациях (Kulikov and Vakhitov 1995).

4.2.2.2. Изменения генов 45S рРНК у амфиплоида Ae. sharonensis x Ae. umbellulata

Экспрессию генов рРНК в отдельных локусах NOR можно оценить путем сравнения силы сигналов после окрашивания серебром и в результате FISH с

пробой рДНК. Полученные Бадаевой Е.Д. результаты окрашивания серебром (см. выше) и наши результаты FISH-гибридизации (Рис. 31) показывают, что существуют различия по уровню экспрессии между индивидуальными локусами NOR, которые не коррелируют с дозой генов в этих локусах. Последняя особенность характерна для генома *Ae. sharonensis* TH01- одного из диплоидных родительских видов амфиплоида *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata* TH01 x TU04. Хромосома 6S^{sh} несет более выраженный сигнал окрашивания серебром, чем хромосома 5S^{sh} (Рис. 55с), несмотря на явно более низкий сигнал гибридизации с зондом *pTa 71* после FISH (Рис. 31а). Это подразумевает, что локус 5S^{sh} имеет более высокую долю неактивных генов рРНК, по сравнению с локусом 6S^{sh}. Следовательно, феномен супрессии NOR, или ядрышкового доминирования проявляется у диплоидов также как у аллополиплоидов, которые более хорошо изучены в этом отношении (Pontes et al., 2007; Preuss et al. 2008). Причины и механизмы дифференциальной экспрессии NOR в диплоидных геномах еще предстоит выяснить.

Наши результаты показали, что у аллополиплоидов процесс инактивации NOR сопровождается их количественными изменениями, которые имеют односторонний характер, затрагивая один из родительских субгеномов. Большинство изученных аллополиплоидов S₂-S₄ имеют сумму локусов рДНК, наблюдаемых у родителей (Рис. 31). Локусы рДНК на хромосомах 1U:2U и 5U выглядят без изменений по сравнению с соответствующими локусами родительского вида. Однако, в некоторых аллополиплоидных растениях поколений S₃ и S₄ наблюдается значительная редукция интенсивности сигнала NOR на хромосоме 6S^{sh} (Табл. 9), затрагивающая обе гомологичные хромосомы (Рис. 31д), а у двух растений S₃ локус NOR на одном из гомологов полностью отсутствовал (Рис. 31г). Более низкая степень редукции сигнала *pTa 71* отмечалась для хромосомы 5S^{sh}, начиная с S₃ поколения. Эти результаты свидетельствуют о том, что у аллополиплоида

ТН01 x TU04 супрессия генов 45S рДНК в геноме *Ae. sharonensis* связана с их частичной элиминацией в определенных хромосомных локусах (6S^{sh}).

Инсерция внутри ETS *Ae. umbellulata* позволила дискриминировать фрагменты ДНК обоих родителей у аллополиплоида ТН01 x TU04 на картине блот-гибридизации по Саузерну. Все растения S₂-S₃ поколений имели последовательности ETS, наследуемые от обоих родителей, однако, количество единиц рДНК, наследуемых от *Ae. sharonensis* уменьшалось, о чем свидетельствовала редукция интенсивности соответствующих фрагментов рестрикции после гидролиза различными эндонуклеазами (Рис. 33). У аллополиплоидных растений один фрагмент рестрикции от *Ae. sharonensis* после гидролиза *Taq* I полностью отсутствовал (Рис. 33b). Принимая во внимание тот факт, что данная эндонуклеаза нечувствительна к метилированию по цитозину, измененный профиль рестрикции может отражать резкое уменьшение числа копий отдельного семейства рДНК. Это событие, по всей видимости, может обуславливать редукцию сигнала *pTa 71* на хромосомах 5S^{sh} и 6S^{sh} *Ae. sharonensis* в поколениях S₃ и S₄ аллополиплоида (Рис. 31d,e). Однако, с помощью FISH мы не смогли обнаружить уменьшение сигнала рДНК у растений S₂, возможно, из-за меньшей чувствительности этого метода к количественным изменениям, по сравнению с Саузерн-гибридизацией, или же по причине недостаточного количества исследованных растений. Редуцированная интенсивность фрагментов Саузерн-гибридизации может также отражать дивергенцию в районах рестрикционных сайтов у некоторой части единиц рДНК *Ae. sharonensis*.

Односторонняя элиминация рДНК может быть частью более обширного процесса делеции геномной ДНК, индуцированного аллополиплоидией. Shaked et al. (2001) показали, что у аллополиплоида ТН01 x TU04 14% локусов от *Ae. sharonensis* были элиминированы, тогда как только 0.5% локусов *Ae. umbellulata* подверглась элиминации, причем большая часть этих изменений произошла уже на стадии F₁ после скрещивания. Используя

набор синтетических аллополиплоидов *Triticum-Aegilops*, Han et al (2005) продемонстрировали, что примерно 70-90% копий тандемного повтора ДНК одного из родителей подверглись элиминации к поколению S₃. Адаптивная значимость этих изменений неизвестна, поскольку не было выявлено никакой ассоциации с наблюдаемыми фенотипическими признаками.

Появление нового CAPS-фрагмента (Рис. 34) указывает на возможное возникновение и амплификацию новой последовательности рДНК всего за несколько поколений. Быстрая эволюция и (или) амплификация новых семейств рДНК и их гомогенизация между отдельными локусами рДНК ранее наблюдалась у синтетических гибридов табака (Skalicka et al. 2003). Dadejova et al. (2007) изучали формирование эпигенетических паттернов экспрессии генов рРНК у данных гибридов и предположили, что гомогенизации подвергаются, в первую очередь, активно экспрессирующиеся единицы рДНК. У *Nicotiana tabacum* конверсия рибосомальной ДНК также ассоциируется с неметилированной, деконденсированной и вследствие этого активной фракцией единиц (Lim et al. 2000). Новая последовательность рДНК у амфиплоида TH01 x TU04 имеет сайты *Msp* AI1, характерные для активных единиц *Ae. umbellulata*. Следовательно, эта последовательность могла возникнуть благодаря процессу гомогенизации, как и предполагали Dadejova et al. (2007).

Ядрышковое доминирование или сайленсинг генов рРНК у полиплоидов, по видимому, опосредован эпигенетическими изменениями этих генов, такими как метилирование ДНК, ацетилирование гистонов и тд (Chen and Pikaard 1997). Гены рРНК у растений значительно метилированы (Delseny et al. 1984; Torres-Ruiz and Hemleben 1994). Однако, были найдены некоторые специфические районы в составе повторяющихся единиц рДНК, которые регулярно сохраняют неметилированный или слабометилированный статус (Flavell et al. 1988; Jure and Zimmer 1990). Особый интерес в этой связи представляет район гена рРНК, где локализуется промотор (TIS) и другие регуляторные элементы транскрипции. Для того, чтобы протестировать

возможность изменений в характере метилирования единиц рДНК в ходе аллополиплоидизации, мы провели обработку геномной ДНК чувствительными к метилированию эндонуклеазами *HpaII* и *MspI* с последующей ПЦР- амплификацией района, прилегающего к промотору с 3'- конца, и ограниченного сайтами для праймеров PII и PIV (Рис. 32). Учитывая редукцию интенсивности ПЦР- продукта *Ae. umbellulata* у амфиплоида ТН01 х ТУ04 (Рис. 35b,c), мы предположили, что единицы рДНК *Ae. umbellulata* менее метилированы в исследуемом районе по сравнению с единицами *Ae. sharonensis*. Наблюдаемая относительно высокая интенсивность фрагментов ПЦР последнего вида весьма вероятно отражает массовый процесс метилирования 45S рДНК, поскольку использованные праймеры позволяют амплифицировать большую часть единиц рДНК обоих диплоидных геномов аллополиплоида. Однако, основываясь только на результатах ПЦР, мы не можем оценить точно: какое количество копий рДНК подверглось метилированию. Таким образом, более высокая относительная концентрация 5-метилцитозина в промоторном районе рДНК *Ae. sharonensis* может быть связана с супрессией генов рРНК в указанном геноме у синтетического аллополиплоида и с последующей их частичной элиминацией. Аналогично, было показано участие процесса метилирования ДНК в супрессии рДНК ржи на хромосоме 1R у аллополиплоидного тритикале (Neves et al. 1995). Наряду с элиминацией части геномной ДНК, изменение паттерна ее метилирования является значительным и непосредственным ответом на фактор полиплоидизации, поскольку этим изменениям подвергается примерно 13% локусов в составе межвидовых гибридов F₁ пшеницы (Shaked et al. 2001).

Для того, чтобы оценить долговременные последствия аллополиплоидизации на организацию генов рРНК, мы сравнили данные, полученные на синтетическом гибриде ТН01 х ТУ04 с данными распределения локусов 45S рДНК у естественных аллополиплоидов, имеющих сходный геномный состав. Два тетраплоидных вида- *Ae. variabilis* (син. *Ae.*

peregrina) и *Ae. kotschyi*, как известно, содержат U и S- геномы, ведущие свое происхождение от *Ae. umbellulata* и *Ae. longissima/ Ae. sharonensis* (Feldman 1965; Kimber and Yen 1989; Badaeva et al. 2004). Анализ *Ae. variabilis* с использованием методики окрашивания серебром обнаружил только 2 пары активных NOR, что указывает на супрессию ядрышковой активности хромосом S^v генома (Cermeno et al. 1984). FISH с зондами *pTa 71* и *pTa 794* (5S рДНК) выявил частичную потерю генов рРНК на хромосомах S-генома как у *Ae. variabilis*, так и у *Ae. kotschyi*; у первого вида эта потеря была более заметна на хромосоме 5S^v, тогда как у последнего- на хромосоме 6S^k (Badaeva et al. 2004). Следовательно, элиминация рДНК на хромосомах S-генома, наблюдаемая у синтетического аллополиплоида ТН01 х ТУ04, по всей видимости, отражает процессы реорганизации рДНК, происходившие у естественных аллополиплоидов.

4.2.2.3. Сходство количественных изменений локусов 5S рДНК у синтетических и природных аллополиплоидов

Геномная организация 5S рДНК у различных видов *Triticum* и *Aegilops* была детально изучена в предыдущих работах (Appels et al. 1980; Dvorak et al. 1989; Kellogg and Appels 1995; Baum et al. 1998; Baum et al. 2004). Были идентифицированы два основных субсемейства этих генов с мономерами длиной ~ 0.4 и 0.5 тпн (5SDNA-1 и 5SDNA-2, соответственно). Установлено, что у видов A-генома, в том числе, *T. urartu* повторяющаяся единица субсемейства 5SDNA-1 имеет длину 330-370 пн (Dvorak et al. 1989; Kellogg and Appels 1995). Показано, что различия в длине мономеров обусловлены инсерциями (делециями) внутри нетранскрибируемого спейсера (Рис. 36). Для всех видов трибы Triticeae кластеры субсемейств 5SDNA-1 и 5SDNA-2 локализованы на хромосомах первой и пятой гомеологичных групп, соответственно (Appels et al. 1980; Dvorak et al. 1989).

В настоящей работе использовали материал трех синтетических аллополиплоидов *Triticum* х *Aegilops* для поиска и анализа изменений в

составе 5S рДНК. FISH-метод не выявил каких-либо изменений по числу и локализации локусов 5S рДНК у изученных аллополиплоидов по сравнению с их родителями (Рис. 37). Наряду с этим, у каждого из аллополиплоидов обнаружены количественные изменения отдельных локусов, содержащих 5S рДНК. Эти изменения включают как снижение интенсивности сигналов на хромосомах 1D и 1A у аллополиплоидов TМУ38 x TQ27 и TTD20 x TQ27, соответственно (Рис. 37г,з), так и увеличение сигнала на хромосоме 1S^{sh} у гибрида TU04 x TH01 (Рис. 37е). Такие изменения могут быть связаны с соответствующими событиями делеции и амплификации последовательностей 5S рДНК в локусах хромосом 1-ой гомеологической группы. Пока не ясно, случайно ли изменения затрагивают только хромосомы указанной группы?

С эволюционной точки зрения представляет интерес сравнить геномную организацию 5S рДНК у синтетических аллополиплоидов с таковой у естественных полиплоидов, имеющих сходный геномный состав. К настоящему моменту детально изучена организация 5S рДНК у мягкой пшеницы *T. aestivum* с геномным составом ВВААDD, аналогичным геномному составу синтетического аллополиплоида TTD20 x TQ27. У пшеницы сайты 5S рДНК расположены на хромосомах первой и пятой групп (Appels et al. 1980; Dvorak et al. 1989; Mukai et al. 1990). Сайты на хромосомах 1В и 5В наиболее интенсивные; менее интенсивные сайты расположены на хромосомах 1D, 5D, 5А, и только при большом разрешении удается выявить дополнительный сайт на хромосоме 1А, имеющий очень низкую интенсивность. Синтетический аллополиплоид TTD20 x TQ27 имеет сходную картину гибридизации с зондом 5S рДНК (Рис. 37з), причем сайт на хромосоме 1А показал уменьшение сигнала по сравнению с родительским видом *T. dicoccoides* (Рис. 37ж).

Как показала Саузерн-гибридизация после обработки геномной ДНК эндонуклеазой *Msp* I, вид *T. urartu* имеет спектр фрагментов рестрикции, соответствующий только одному субсемейству 5S рДНК с длиной мономера

330 п.н. (рис. 38б). При этом ПЦР-анализ показал наличие у этого вида и другого субсемейства с мономером ~ 0.5 тпн (Рис. 39в). Сайт узнавания *Msp* I находится в консервативной кодирующей части гена 5S рРНК (Рис. 36) и выявлен у большинства последовательностей 5S рДНК злаков, имеющих в базах данных. Так как эндонуклеаза *Msp* I чувствительна к метилированию внешнего цитозина в сайте гидролиза (mCCGG), можно предположить, что отсутствие в рестрикционном спектре *T. urartu* фрагментов, соответствующих субсемейству 0.5 тпн, связано с метилированием указанного сайта у последовательностей этого субсемейства. Как было установлено ранее, субсемейства 0.3 и 0.5 тпн находятся в локусах хромосом 1А и 5А, соответственно (Dvorak et al. 1989). Следует отметить, что локус на хромосоме 1А имеет более интенсивный сигнал гибридизации по сравнению со вторым локусом (Рис. 37б). В случае генов 5S рРНК, имеющих специфический механизм транскрипции под действием РНК-полимеразы III, процесс инактивации генов сопровождается их метилированием в составе кодирующей части гена (Gerlach and Dyer 1980). Не исключена вероятность того, что инактивированные гены могут элиминироваться в ходе эволюции, однако, влияние метилирования на экспрессию генов 5S рРНК и последующую их элиминацию еще предстоит установить.

Аллополиплоид ТМУ38 х ТQ27 демонстрировал аддитивность наследования рестрикционных фрагментов от обоих родителей, однако, фрагменты от *Ae. tauschii* имели относительно низкую интенсивность (Рис. 38б). Этот сдвиг интенсивности в сторону фрагментов *T. urartu* обнаружен в каждом проанализированном образце ДНК амфиплоида (S_2 , S_3). Снижение интенсивности фрагментов *Ae. tauschii* может быть связано как с метилированием сайтов узнавания *Msp* I в составе соответствующих последовательностей 5S рДНК, так и с их дивергенцией, а также частичной делецией этих последовательностей. На вероятность делеции указывает редукция сигнала в одном из локусов аллополиплоида (хромосома 1D), принадлежащих геному *Ae. tauschii* (Рис. 37г). По видимому, указанное

изменение произошло на стадии S_2 или ранее и сохранялось в следующем поколении.

С помощью ПЦР нам не удалось зафиксировать количественные изменения 5S рДНК у изученных аллополиплоидов. По видимому, для этой цели необходим ПЦР-анализ субсемейств 5S рДНК, локализованных в отдельных локусах. Однако, консервативность гена 5S рРНК и ограниченная длина межгенного спейсера обуславливают сложность подбора специфических праймеров для ПЦР-анализа локальных количественных изменений 5S рДНК у полиплоидных форм. Следует отметить, что ни ПЦР-метод, ни Саузерн-гибридизация не выявили появления новых фрагментов 5S рДНК или полного исчезновения фрагментов родительских видов на ранних стадиях образования изученных аллополиплоидов.

Анализ первичной структуры клонированных последовательностей 5S рДНК из генома аллополиплоида TMU38 x TQ27 не показал каких-либо существенных изменений по сравнению с аналогичными последовательностями родительских видов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что у изученных синтетических аллополиплоидов *Triticum* x *Aegilops* в целом сохраняется структурная организация генов 5S рРНК, характерная для соответствующих родительских видов. Наряду с этим, в каждом из аллополиплоидов были выявлены количественные изменения 5S рРНК генов, затрагивающие отдельные локусы одного из родительских геномов. Похожие изменения (делеции) были обнаружены нами при анализе 45S рРНК генов, при этом в последнем случае они сопровождались процессом инактивации копий, подвергавшихся элиминации (см. предыдущую главу). Предстоит выяснить: связаны ли количественные изменения генов 5S рДНК у амфиплоидов с экспрессией этих генов. В обоих случаях нами было показано, что процессы реорганизации генов рРНК у синтетических амфиплоидов неслучайны и воспроизводятся в составе природных аллополиплоидов со сходным геномным составом. Это указывает на то, что

формирование сбалансированной организации генов рРНК происходит на ранних стадиях аллополиплоидизации и эта организация сохраняется на протяжении дальнейшей эволюции.

4.3. *VRN-1* гены пшеницы как модель эволюционных изменений гомеологичных генов в ходе аллополиплоидизации

В Обзоре литературы представлены события, связанные с процессами дивергенции гомеологичных генов у аллополиплоидов растений (гл. 1.3.5.). Эти процессы приводят к трем основным последствиям: 1) утрате функции гомеологичного гена в результате его псевдогенизации; 2) субфункционализации или изменению паттерна (способа) регуляции гена в рамках той же функции; 3) неофункционализации или возникновению выраженных структурных изменений в гене со сменой его функции. Наиболее часто фиксируемыми являются 2 первых механизма, тогда как примеры неофункционализации весьма ограничены, что связано с трудностями поиска подобных локусов и установления их эволюционной истории. С точки зрения расширения адаптивного потенциала аллополиплоидов в сравнении с диплоидными формами огромное значение имеет механизм субфункционализации, поскольку этот механизм позволяет варьировать реакцию на те или иные условия за счет переменной активности гомеологичных генов, имеющих различные паттерны экспрессии (Chauldhary et al. 2009). Способы дивергенции гомеологов индивидуальны для каждого гена и зависят от того, какие районы гена играют ключевую роль в его регуляции. Особенно значимыми для адаптивного успеха аллополиплоидов являются гены, определяющие длительность вегетационного периода и время наступления фазы цветения, в том числе, основной ген- *VRN-1*, вариация которого во многом определяет разнообразие яровых и озимых форм пшеницы, произрастающих в различных климатических условиях.

4.3.1. Влияние структурных изменений регуляторных районов *VRN-B1* гена на его экспрессию и время колошения

Успех в исследовании генетической регуляции отдельных локусов во многом определяется созданием эффективных генетических моделей. В качестве такой модели мы использовали две изогенные линии (NIL), полученные в результате интрогрессии различных аллелей *VRN-B1* от яровых сортов Саратовская 29 (генотип *VRN-A1 VRN-B1^S vrn-D1*) и Диамант 2 (генотип *VRN-A1 VRN-B1^{Dm} vrn-D1*) в озимый сорт Безостая 1. Предварительно было показано, что исходные яровые сорта почти не отличались по сроку колошения. Однако, две замещенные линии, полученные на основе этих сортов (генотипы *vrn-A1 VRN-B1^S vrn-D1* и *vrn-A1 VRN-B1^{Dm} vrn-D1*, соответственно) различались на 10-14 дней по времени выколашивания (Майстренко 1992). Изогенные линии на основе сорта Безостая 1 позволили более точно определить эффект *VRN-B1^S* and *VRN-B1^{Dm}* аллелей на чувствительность к яровизации и время колошения. Различие по времени колошения между iBz/S29 и iBz/Dm линиями составляло 14 дней (Efremova et al. 2011).

Переход от озимого к яровому типу развития обычно ассоциируется с мутациями в регуляторных районах гена *VRN-1*, а именно: в промоторе и 1-м интроне. Эти мутации существенным образом влияют на время наступления репродуктивной фазы, поэтому их анализ является критическим для понимания регуляции процесса инициации цветения (см. обзор Distelfeld et al. 2009). На основе сравнительного анализа доступных в базах данных последовательностей *VRN-1* из генома мягкой пшеницы, мы сконструировали праймеры к обоим регуляторным районам и провели их ПЦР-анализ в составе изогенных линий. Последующее секвенирование ПЦР-продуктов показало полную идентичность промоторных последовательностей *VRN-B1* в обеих линиях и исходных сортах-донорах. Также эти последовательности оказались идентичны ранее изученной в составе рецессивного гена *VRN-B1*. Yan et al. (2004a) показали отсутствие

полиморфизма в промоторных последовательностях среди доминантных и рецессивных аллелей *VRN-B1*. Данная особенность характерна и для промоторного района *VRN-D1* гена. В отличие от *VRN-B1* и *VRN-D1*, различные доминантные аллели локуса *VRN-A1* связаны с небольшими инсерциями или делециями (*VRN-A1a* и *VRN-A1b*, соответственно) (Yan et al. 2004a). Однако, некоторые доминантные аллели *VRN-A1* не имеют каких-либо изменений в промоторе (Fu et al. 2005; Pidal et al. 2009). Все эти данные указывают на существование альтернативных районов внутри *VRN-1* гена, контролирующих ответ на яровизацию. Анализ различных яровых сортов пшеницы показал, что крупные делеции в 1-м интроне *VRN-1* могут детерминировать яровой образ жизни (Fu et al. 2005).

Полученные нами данные служат доказательством того, что структура 1-го интрона *VRN-1* не только влияет на чувствительность к яровизации, но и может определять различие в сроке колошения. С помощью ПЦР и анализа первичной структуры этого района внутри аллелей *VRN-B1^{Dm}* и *Vrn-B1^S*, мы обнаружили значительные отличия аллеля *Vrn-B1^S*, связанные с делецией 0.8 тпн и дупликацией 0.4 тпн (Рис. 40). Кроме этих изменений никакие другие различия между *VRN-B1^{Dm}* и *Vrn-B1^S* не были обнаружены, ни в составе кодирующих экзонов, ни в других интронах. Аллель *VRN-B1^{Dm}*, за исключением одной нуклеотидной замены в 1-м интроне, не отличался от ранее изученного аллеля *VRN-B1a*. Мы обозначили новый аллель *VRN-B1^S* как *VRN-B1c*, чтобы подчеркнуть его отличие от *VRN-B1a* и аллеля *VRN-B1b*, имеющего одну SNP и делецию 36 пн в первом интроне по сравнению с *VRN-B1a* (Santra et al. 2009).

Следующей задачей был сравнительный анализ экспрессии (транскрипции) аллелей *VRN-B1a* и *VRN-B1c* с целью выявления степени влияния структурных изменений в первом интроне *VRN-B1c* на уровень транскрипции гена. Анализ транскрипции *VRN-B1* в листовых апексах изогенных линий на стадии 3-го листа обнаружил 10-кратное превышение количества транскриптов в линии с аллелем *VRN-B1c* по сравнению с

линией, содержащей *VRN-B1a* (Рис. 42). Уровень транскрипции на стадии 5-го листа в последней линии был сопоставим с уровнем транскрипции в линии с *VRN-B1c* на стадии 3-го листа (Рис. 41). Более высокая транскрипционная активность аллеля *VRN-B1c* коррелировала со значительно более ранним сроком колошения у линии i:Bz1/S29 (см. выше).

Возникает вопрос: каким образом структурные изменения в составе 1-го интрона *VRN-B1c* могут обуславливать повышенный уровень транскрипции и более раннее колошение соответствующей изогенной линии. Важное значение 1-го интрона было показано открытием, по крайней мере, 15 независимых делеций и двух инсерций повторяющихся элементов, ассоциированных с яровым типом развития у пшеницы и ячменя (von Zitzewitz et al. 2005, Dubcovsky et al. 2006, Fu et al. 2005, Cockram et al. 2007). Как правило, эти мутации затрагивают один и тот же район длиной 2.8 тпн, прилегающий к левой границе интрона 1. Более того, начальный участок этого сегмента длиной 440 пн проявляет высокую степень консерватизма у пшеницы и ячменя (Fu et al. 2005). Следует подчеркнуть, что наблюдаемые изменения внутри *VRN-B1c* также затрагивают 5'- фланкирующую последовательность 1-го интрона (Рис. 40). Эти изменения могут элиминировать связывающий сайт для предполагаемого репрессора *VRN-1* (Fu et al. 2005), или оказывать эпигенетическое влияние на состояние окружающего хроматина (Trevaskis et al. 2007).

Было показано, что состояние репрессии гена *VRN-1* достигается высоким уровнем метилирования гистона H3, и уровень его метилирования значительно уменьшается в результате делеций, перекрывающих начало 1-го интрона (Oliver et al. 2009). Аналогичное высокометилированное состояние белков хроматина отвечает и за подавление экспрессии гена *FLC* арабидопсиса, кодирующего белок- репрессор цветения (De Lucia et al. 2008; Neo and Sung 2011). Мы предполагаем, что изменения в 1-м интроне аллеля *VRN-B1c* могут препятствовать связыванию белкового комплекса, иницирующего процесс метилирования гистона H3. Снижение процесса

репрессирующего метилирования H3 приводит к более активному состоянию хроматина и, как следствие, повышенной транскрипции *VRN-B1c*, относительно *VRN-B1a*. В результате более раннее накопление транскриптов *VRN-B1* выше порогового уровня в линии i:Bz1*VRN-B1c* может являться причиной для более раннего срока колошения у этой линии относительно линии i:Bz1*VRN-B1a* (Рис. 56).

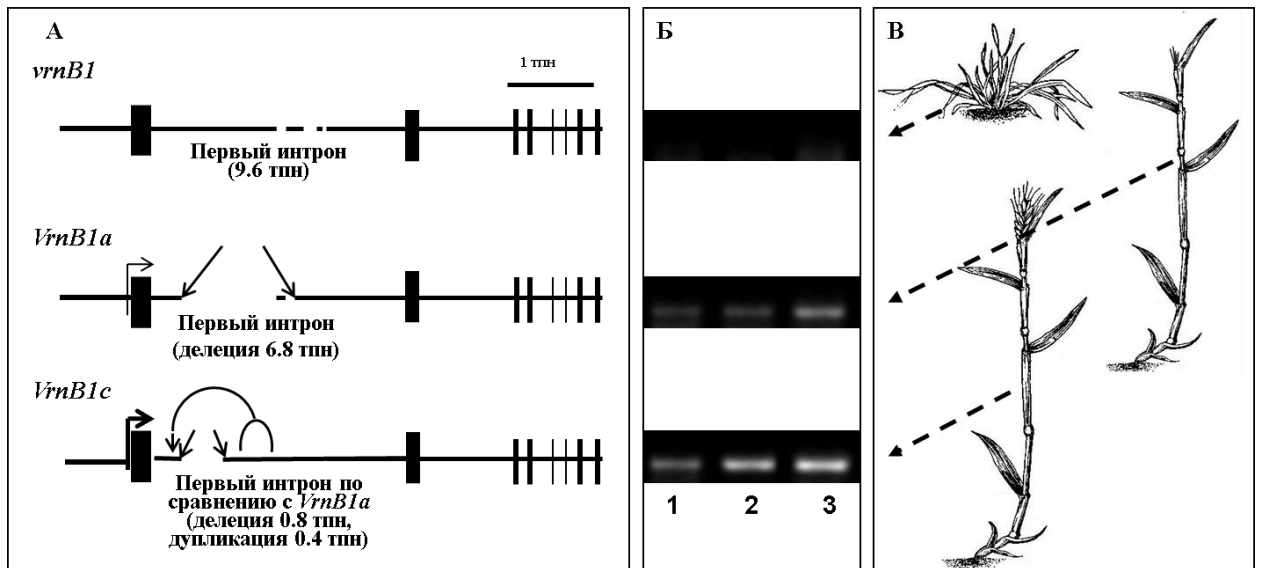


Рис. 56 Влияние структурных изменений в первом интроне *VRN-B1* на транскрипцию и фенотип растения. А- схема структурной организации различных аллельных вариантов: *vrn-B1*; *VRN-B1a*; *VRN-B1c*. Черные вертикальные прямоугольники обозначают экзоны. Показаны: крупная делеция в составе первого интрона *VRN-B1a* относительно рецессивного аллеля *vrn-B1*, а также изменения внутри первого интрона *VRN-B1c* относительно доминантного аллеля *VRN-B1a*.

Б- транскрипция аллелей: *vrn-B1* в сорте пшеницы Безостая 1; *VRN-B1a* и *VRN-B1c* в изогенных линиях сорта Безостая 1 на различных стадиях развития (1- 3 листа, 2 – 4 листа, 3 – 5 листа).

В- схематическое изображение фенотипа пшениц с рецессивным *vrn-B1* и доминантными аллелями гена *VRN-B1* на 8 неделе развития

С учетом более высокого уровня транскрипции аллеля *VRN-B1c*, следовало ожидать, что уровень *VRN-B1* транскрипции у гибридов F₁, полученных от скрещивания изогенных линий будет более близок к линии i:Bz1*VRN-B1c*, чем к линии i:Bz1*VRN-B1a*. Однако, как по уровню транскрипции (Рис. 42), так и по фенотипу (срок колошения) гибриды F₁ показывали больше сходства с линией i:Bz1*VRN-B1a* (Emtseva et al. 2012a).

При этом уровень транскрипции в F_1 находился в пределах широкого стандартного отклонения, что затрудняет интерпретацию данных. Будущие исследования позволят более детально оценить характер взаимодействия между двумя *VRN-B1* аллелями.

В данной работе транскрипционная активность доминантных аллелей *VRN-1* ($Vrn-A1 > Vrn-B1c > Vrn-B1a$) коррелировала со сроком колошения, установленным для соответствующих изогенных линий. Этот результат согласуется с данными транскрипционного анализа *VRN-1*, у изогенных линий ‘Triple Dirk’ (Loukoianov et al. 2005). Этот анализ выявил более раннее относительно других гомеоаллелей (*VRN-B1* и *VRN-D1*) появление транскриптов *VRN-A1* в листьях и апексах растений. Наивысший уровень экспрессии *VRN-A1* гена обеспечивает эпистатический эффект последнего на доминантные аллели *VRN-B1* и *VRN-D1*. Раннеспелые сорта мягкой пшеницы, как правило, несут доминантный ген *VRN-A1*, тогда как моногенно доминантные по *VRN-B1* (или *VRN-D1*) сорта являются позднеспелыми (Pugsley 1971; Košner and Pánková, 2004). Однако, различие по сроку колошения между линиями с *VRN-A1* и *VRN-B1c* составляет примерно половину от разницы между линиями с *VRN-A1* и *VRN-B1a*. Этот факт впервые показывает, что ген *VRN-B1*, изначально характеризующийся как «слабый» ген ответа на яровизацию, может иметь довольно сильный эффект в зависимости от своего аллельного состояния.

Мы также провели анализ взаимодействия между доминантными и рецессивными гомеоаллелями *VRN-1*. В присутствии одного доминантного аллеля (*VRN-A1* или *VRN-B1*), рецессивные аллели гомеологичных локусов начинали транскрибироваться (Рис. 41). Обнаружение транскриптов рецессивных генов *vrn-B1* и *vrn-D1* в апексах линии i:Bz1*VRN-A1*, начиная с 3-го листа, соответствует ранее полученным данным, которые показывают начало транскрипции этих генов на той же стадии в линии ‘Triple Dirk D’ (*VRN-A1vrn-B1vrn-D1*) (Loukoianov et al. 2005). Уровни транскрипции рецессивных генов *vrn-1* были пропорциональны уровню транскрипции

доминантного гомеоаллеля и влияние доминантного аллеля *VRN-1* на рецессивные коррелировало с его собственной транскрипционной активностью ($VRN-A1 > VRN-B1c > VRN-B1a$) (Рис. 41). Наши результаты, таким образом, подтвердили данные Loukoianov et al. (2005), указывающие на скоординированную транскрипцию доминантных и рецессивных аллелей *VRN-1* и их совместное влияние на переход к генеративной фазе у неярвизированных растений.

Ранее была предложена модель, которая предполагает существование обратной функциональной связи между генами *VRN-1* и *VRN-2* (Loukoianov et al. 2005). Согласно этой модели, продукт гена *VRN-1* оказывает супрессирующее влияние на ген *VRN-2*, продукт которого, в свою очередь, подавляет транскрипцию рецессивных аллелей *vrn-1*. В соответствии с этой гипотезой мы обнаружили уменьшение транскриптов *VRN-2* в изогенных линиях с экспрессирующимися аллелями *VRN-B1*, которое, однако, было недостоверным (Рис. 42). Сходное снижение транскрипции *VRN-2* было обнаружено в линиях Triple Dirk, имеющих повышенный уровень транскриптов *VRN-1* (Loukoianov et al. 2005). Следует сказать, что в настоящий момент не существует данных, показывающих прямую регуляцию *VRN-1* продуктом гена *VRN-2*. Более того, некоторые авторы показали, что эффект *VRN-2* на активность *VRN-1* является фотопериод-зависимым (Trevaskis et al. 2006; Hemming et al. 2008). Это предполагает не прямое влияние *VRN-2* на экспрессию *VRN-1*, возможно, посредством регуляции уровня экспрессии гена *VRN-3 (FT)* (Рис. 19).

4.3.2. Разнообразие *VRN-1* гаплотипов, определяющих яровой образ жизни у гексаплоидной пшеницы

Разработка и тестирование специфических праймеров пригодных для идентификации всего разнообразия аллелей генов *VRN* является необходимым предварительным этапом для быстрой и эффективной оценки аллельного полиморфизма этих генов в растительном материале различного

происхождения. Ранее для скрининга гена *VRN-A1* обычно использовались три пары праймеров, которые позволяют идентифицировать аллельные варианты в промоторном районе: аллели *VRN-A1a* и *VRN-A1b*, или 1-м интроне- *VRN-A1c* (Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). По одной паре праймеров на ген обычно применялись для идентификации генов *VRN-B1* и *VRN-D1*, самые распространенные аллели которых содержат крупные делеции в первом интроне: *VRN-B1a* и *VRN-D1a* (Fu et al. 2005). В дополнение к ним, маркеры для гена *Vrn-B3* (*Vrn5*) также использовались для анализа яровых сортов пшеницы (Yan et al. 2006). Позднее была установлена локализация гена *Vrn4* и разработаны маркеры к этому гену (Yoshida et al. 2010). Гены *Vrn-B3*, *Vrn4* являются дополнительными генами яровизации и их вклад в формирование аллельного разнообразия сортов мягкой пшеницы весьма ограничен. По данным различных авторов наиболее распространенными являются аллели генов *VRN-1*, особенно аллели *VRN-A1* и *VRN-B1*. Интересно отметить, что среди китайских сортов, традиционно культивируемых как озимые широко распространен доминантный аллель *VRN-D1* (Zhang et al. 2008). Из 147 яровых сортов китайского происхождения в 10 сортах не удалось выявить присутствие доминантных аллелей генов *VRN-1*, основываясь на разработанных маркерах. В этой связи интересно сопоставить данные генетического анализа и ПЦР-анализа аллелей *VRN-1*, полученные на материале яровых сортов северо-западного побережья США. Из 35 изученных сортов соответствие между обоими типами данных было отмечено только для 17 сортов (Santra et al. 2009). Если рассматривать по индивидуальным локусам, то наибольшее расхождение между результатами генетического анализа и ПЦР-скрининга было отмечено для локуса *VRN-B1* (88%), а также *VRN-D1* (12%), тогда как для *VRN-A1* никакого расхождения отмечено не было. Все эти факты говорят о том, что для гена *VRN-A1* существующие на тот момент ПЦР-маркеры хорошо охватывали имеющееся аллельное разнообразие, в то время как для двух других генов-гомеологов

маркеры были недостаточно эффективны и в этих случаях требовался поиск новых, более эффективных систем маркеров.

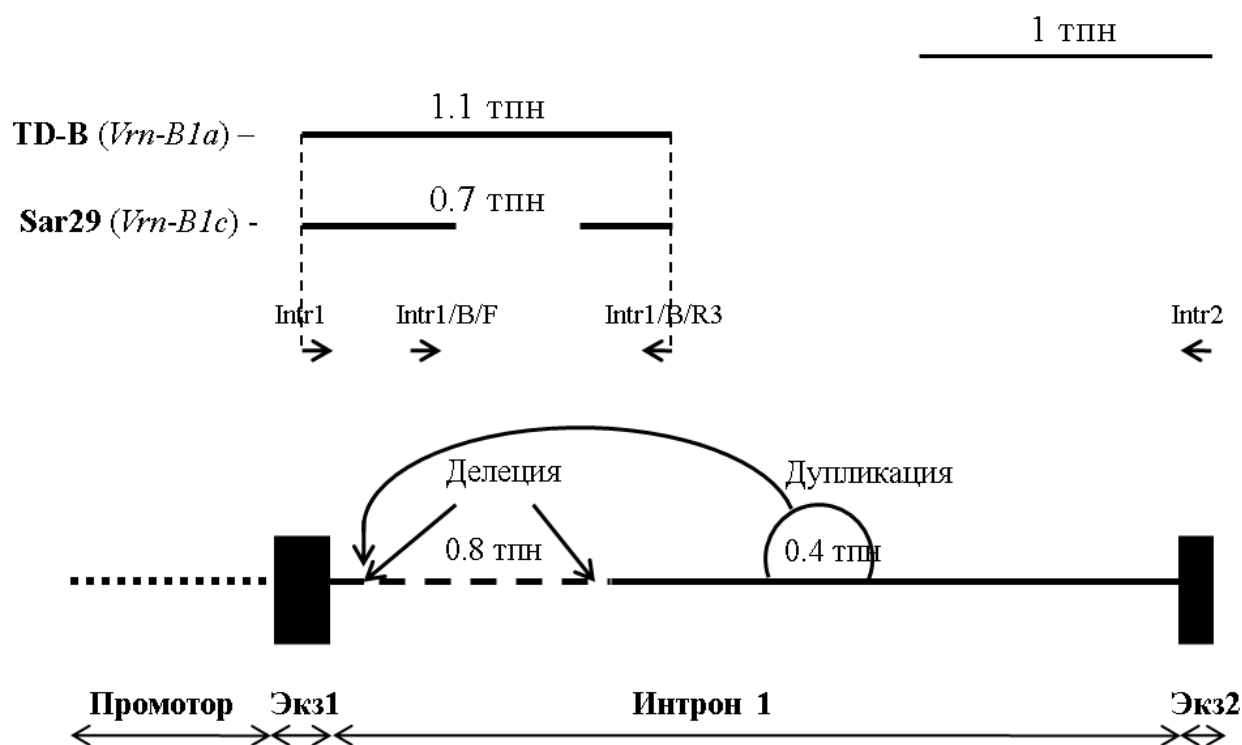


Рис. 57 Частичная схема локуса *VRN-B1* с разработанными к нему маркерами для выявления основных аллелей: *VRN-B1a* и *VRN-B1c*. Стрелки над схемой указывают позиции специфических праймеров. Наверху отмечены диагностические продукты ПЦР для обоих аллелей *VRN-B1* (Shcherban et al. 2012).

Праймеры **Intr1/B/F** и **Intr1/B/R3** (Рис. 57) широко использовались в ПЦР-анализе *VRN-B1* локуса для детекции крупной делеции в 1-м интроне, которая характерна для аллеля *VRN-B1a* (Fu et al. 2005; Iqbal et al. 2007; Santra et al. 2009). В отдельных работах были зафиксированы случаи, когда данная комбинация не давала продукта амплификации, несмотря на наличие доминантного локуса *VRN-B1* по результатам генетического анализа (см. выше). В нашем предварительном ПЦР исследовании 26 яровых сортов мягкой пшеницы мы обнаружили 7 сортов-носителей доминантного гена *VRN-B1*, у которых тем не менее отсутствовали продукты амплификации с вышеуказанной комбинацией праймеров (Shcherban et al. 2011). Используя

праймер *Intr1/B/R3* в комбинации с разработанным нами праймером *Intr1*, для 6 из 7 сортов был получен ПЦР продукт длиной ок. 0.7 тпн, соответствующий впервые охарактеризованному нами аллелю *VRN-B1c* (Рис. 57). Секвенирование продуктов ПЦР подтвердило наличие данного аллеля у этих сортов. Отсутствие продукта с первой комбинацией праймеров в этих случаях объясняется дополнительной делецией, которая перекрывает сайт отжига праймера *Intr1/B/F*. Таким образом, использование комбинации *Intr1 // Intr1/B/R3* позволяет эффективно дискриминировать оба распространенных аллеля *VRN-B1*. Как показал дальнейший анализ большой коллекции яровых сортов мягкой пшеницы указанная комбинация позволяет достаточно эффективно оценить наличие доминантных аллелей *VRN-B1* (Shcherban et al., 2012; Shcherban et al. 2015a). Тем не менее нельзя исключить наличия других доминантных аллелей данного локуса, не выявляемых с помощью этой системы. Одним из таких редких аллелей является аллель *VRN-A1b* (Santra et al. 2009). Этот аллель можно рассматривать как модифицированный вариант аллеля *VRN-B1a*, так как, по сравнению с последним, он содержит небольшую делецию 36 пн в составе 1-го интрона, которая, по-видимому, не имеет какого-либо дополнительного эффекта на срок колошения или чувствительность к яровизации. Milec et al. (2012) разработали свою комбинацию праймеров (“multiplex PCR”), позволяющую идентифицировать все 3 аллеля *VRN-B1* в одной реакции по наличию ПЦР-маркеров длиной 1675 (*vrn-B1*), 1235 (*VRN-B1a*), 1199 (*VRN-B1b*), 849 (*VRN-B1c*) пн. С использованием этой системы был проанализирован обширный материал сортов и линий мягкой пшеницы со всего мира и показано, что аллель *VRN-B1a* является самым распространенным среди аллелей *VRN-B1* локуса (55.3%), тогда как рецессивный аллель *vrn-B1* обнаружен у 31.5% образцов. Аллели *VRN-B1b* и *VRN-B1c* найдены в 5.3 и 7.9% образцов яровой пшеницы, соответственно (Milec et al. 2013). При этом аллель *VRN-B1b* имеет наибольшее распространение в Северной и Южной Америке, а также Азии, и наименьшее - в Европе (1.1%). Однако, следует

обратить внимание, что оценка распространения *VRN-B1b* может быть недостоверной из-за невозможности достаточного разрешения ПЦР-маркеров *VRN-B1a* и *VRN-B1b* в условиях агарозного электрофореза. По этой причине в своем исследовании мы использовали маркеры *VRN-B1* на основе Intr1 // Intr1/B/R3 праймеров.

4.3.2.1. Российские яровые сорта

Проанализировав 90 яровых сортов мягкой пшеницы, распространенных в России и на прилегающих территориях Украины и Казахстана, мы показали, что аллель *VRN-A1a* является наиболее распространенным аллелем (83.3% сортов) (Табл. 2 приложения; Рис. 43). Учитывая короткий период вегетации и отсутствие условий яровизации в течении этого периода на большей территории России (Goncharov and Shitova 1999, Goncharov 2004), нечувствительность к яровизации, по-видимому, является преимущественным фенотипом в этом регионе. Это может объяснить почему российские селекционеры осознанно или неосознанно отбирали нечувствительный к яровизации аллель *VRN-A1a*. Раннее колошение и созревание, свойственное содержащему этот аллель генотипу, позволяет избежать ранних осенних заморозков, которые могут существенно снизить урожайность и качество зерна. Данный аллель, как было ранее показано, также присутствует у 85% канадских яровых сортов пшеницы (Iqbal et al. 2007), а также у большинства современных яровых сортов США, Аргентины и Китая (Yan et al. 2004a, Zhang et al. 2008, Santra et al. 2009). В нашем исследовании аллель *VRN-A1a* обнаружен в комбинации с доминантными *VRN-B1* аллелями у 75.5% сортов (дигенно-доминантные сорта). Доминантные аллели *VRN-B1* обуславливают слабую чувствительность к яровизации, приводя к более позднему цветению. Однако, яровые генотипы, содержащие *VRN-B1* в комбинации с доминантным *VRN-A1* проявляют нечувствительный к яровизации фенотип, благодаря эпистатическому эффекту последнего гена (Pugsley 1971). Из всех изученных нами российских яровых сортов пшеницы, 48.8% имели аллель

VRN-B1a, тогда как 44.4% содержали *VRN-B1c* (Рис. 43). Оставшиеся сорта (6.8%) являлись носителями рецессивного гена *vrn-B1*. Только один сорт из Казахстана содержал доминантный аллель *VRN-D1a* по наличию диагностического продукта амплификации с праймерами Intr1/D/F // Intr/D/R3 (Табл. 5; Табл. 2 приложения). Таким образом, наиболее распространенный гаплотип *VRN-A1a VRN-B1a vrn-D1* был выявлен у 45.5% изученных российских сортов; второй по распространенности гаплотип *VRN-A1a VRN-B1c vrn-D1* - у 32.2% сортов.

Моногенно-доминантные гаплотипы *vrn-A1 VRN-B1a vrn-D1* и *vrn-A1 VRN-B1c vrn-D1* были установлены у 3.3 и 8.8% российских сортов, соответственно. Следует отметить, что последняя группа представлена в основном сортами, произрастающими на территории Западной Сибири и Казахстана. Поскольку аллель *VRN-B1c* определяет более раннее колошение по сравнению с *VRN-B1a* (Efremova et al. 2011), то преобладание *VRN-B1c* среди сортов с моногенным контролем яровизации в Западной Сибири и Казахстане можно объяснить селективным преимуществом данного аллеля для региона с повышенным риском ранних осенних заморозков.

Результаты наших исследований показывают, что нечувствительный к яровизации аллель *VRN-A1a* в комбинации с доминантным *VRN-B1* (*VRN-B1a* или *VRN-B1c*) обеспечивает оптимальную адаптивность и продуктивность яровой пшеницы на большей части России. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о генетическом контроле яровизации в отечественных сортах яровой пшеницы (Goncharov 2002, Stelmakh 1990).

4.3.2.2. Влияние генов VRN-1 и PPD-D1 на время колошения в Европейских яровых сортах

Используя диагностические молекулярные маркеры для большинства распространенных аллелей локусов *VRN-1*, влияющих на чувствительность к яровизации и время колошения, а также маркеры для гена *PPD-D1*,

наиболее сильного локуса фотопериодического ответа, мы изучили коллекцию европейских сортов, представляющих различные эколого-географические районы. Различные физические и климатические условия вызывают отличие по времени колошения между двумя крупными группами сортов: южной Европы и остальной части Европы (Рис. 44А). Это отличие может быть частично обусловлено различной реакцией на фотопериод, ассоциированной с изменчивостью генов *PPD-1*.

Табл. 13 Распределение различных аллелей генов *VRN-1*, *PPD-D1* в основных эколого-географических районах Европы (Shcherban et al. 2015a).

Европейские регионы/ страны (число сортов)	<i>VRN-A1</i>			<i>VRN-B1</i>			<i>VRN-D1</i>		<i>PPD-D1</i>	
	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>PPD-D1b</i>	<i>PPD-D1a</i>
В целом (245)	62.4% (153)	5.3% (13)	32.2% (79)	68.1% (167)	6.5% (16)	25.3% (62)	4.5% (11)	95.5% (234)	91.4% (224)	8.5% (21)
Северная Европа (23)/ Швеция (11), Норвегия (1), Финляндия (11)	100% (23)	0	0	56.5% (13)	4.3% (1)	39.1% (9)	0	100% (23)	95.6% (22)	4.3% (1)
Западная и Центральная Европа (167)/ Британия (19), Франция (22), Бельгия (1), Германия (109), Чехия (5), Румыния (11)	73.0% (122)	1.2% (2)	25.7% (43)	72.0% (120)	7.7% (13)	20.3% (34)	1.2% (2)	98.8% (165)	98.8% (165)	1.2% (2)
Южная Европа (55)/ Португалия (11), Испания (9), Италия (23), Албания (1), бывшая Югославия (2), Греция (2), Болгария (7)	14.5% (8)	20.0% (11)	65.4% (36)	61.8% (34)	3.6% (2)	34.5% (19)	16.4% (9)	83.6% (46)	67.2% (37)	32.7% (18)

Более ранние генетические исследования свидетельствуют о том, что озимые и яровые сорта пшеницы, выращенные в европейских странах северных широт обычно высоко чувствительны к фотопериоду, тогда как сорта более южных широт, как правило, нечувствительны к фотопериоду (Hunt 1979; Worland et al. 1998). Эта тенденция обусловлена тем, что южные сорта, возделываемые в условиях короткого зимнего дня, переходят к

цветению очень поздно, или совсем не переходят,- в случае если они чувствительны к фотопериоду. Для яровых сортов пшеницы, растущих в более северных широтах чувствительность к фотопериоду имеет меньшее значение, тк при весеннем посеве продолжительность периода до колошения приходится на длинный день и как чувствительные, так и нечувствительные сорта зацветают примерно в одно и тоже время, однако, чувствительные- с небольшой задержкой, что в селекционном плане более выгодно, тк позволяет максимально использовать короткий вегетационный период. В соответствии с этим, молекулярно- генетические исследования показали более высокую концентрацию нечувствительного к фотопериоду аллеля *PPD-D1a* в южных регионах Европы (Guo et al. 2010; Kiss et al. 2014). Наши исследования также выявили более высокую частоту *PPD-D1a* в Южной Европе (32%), тогда как в остальной части фотопериод-чувствительный аллель *PPD-D1b* был наиболее распространен (Табл. 13). В целом, аллель *PPD-D1a* характерен только для 8.5% Европейских сортов. Среди этих сортов комбинации с доминантными аллелями *VRN-B1a* или *VRN-D1a* были наиболее частыми (по 5 образцов в каждом гаплотипе).

Kiss et al (2014) обнаружили, что у озимых форм наиболее ранние генотипы содержали нечувствительный к фотопериоду аллель *PPD-D1*, наряду с доминантным *VRN-D1*, тогда как поздние генотипы имели фотопериод- чувствительный аллель *PPD-D1*, независимо от аллельного состояния *VRN-1* генов. В наших полевых экспериментах, при весеннем посеве гаплотипы *PPD-D1a VRN-B1a* или *PPD-D1a VRN-D1a* не отличались значительно по времени выколашивания от соответствующих *VRN-1* гаплотипов имеющих чувствительный аллель *PPD-D1b*. Однако, для более детального изучения эффектов *PPD-D1* на развитие яровых растений пшеницы, требуется большее количество растительного материала, содержащего различные комбинации аллелей *PPD-D1* и *VRN-1*.

При изучении генотипов *VRN-1* европейских сортов, как и в случае российских яровых сортов (см. предыдущую главу), нами было установлено

столь же широкое распространение аллеля *VRN-A1a* (62%) преимущественно среди сортов северной, западной и центральной Европы, имеющих климатические условия, сходные с таковыми у большей части отечественных сортов (Рис. 43; Табл. 13). Широкое распространение данного аллеля в обоих выборках можно объяснить необходимостью раннего созревания, обеспечивающего защиту от повреждающего действия заморозков в конце короткого вегетационного периода. В указанном европейском регионе *VRN-A1a* комбинировался с доминантным *VRN-B1* и рецессивным *vrn-D1* у 62.5% сортов. Эта же комбинация имела примерно одинаковое распространение среди российских сортов яровой пшеницы. Единственное отличие заключалось в том, что в России генотип с аллелем *VRN-B1a* имел 2-кратное превышение над генотипом с аллелем *VRN-B1c*, тогда как в Европе аллель *VRN-B1a* значительно преобладал над *VRN-B1c*, который встречался, главным образом, в восточной Европе (Рис. 43; Табл. 13). Miles и др. (2013) также обнаружили преимущественное распространение *VRN-B1c* аллеля в восточно-европейских странах, прилегающих к России. Следует подчеркнуть, что дигенно- доминантные генотипы *VRN-A1 VRN-B1* и генотипы с одним доминантным геном *VRN-A1* имели сходное время выколашивания, благодаря эпистатической природе *VRN-A1* (Табл. 14). При этом гаплотип *VRN-A1a VRN-B1c* имел немного более раннее колошение (69 дней) по сравнению с гаплотипом *VRN-A1a VRN-B1a* (72 дня) при уровне доверия $p < 0.05$. Такое отклонение можно объяснить влиянием аллеля *VRN-B1c*, обуславливающим более раннее наступление генеративной фазы.

Аллель *VRN-B1a*, имеющий наивысшую частоту среди доминантных аллелей, примерно в равной степени распространен в различных районах Европы (Табл. 13). Интересно, что в Южной Европе гаплотипы с одним доминантным *VRN-B1* или *VRN-D1* были обнаружены у 58% яровых сортов. Для сравнения, в оставшейся части Европы эти гаплотипы были идентифицированы в 17% сортов. Тот факт, что частоты генотипов с

моногенным *VRN-B1* (*VRN-D1*) контролем яровизации имеют тенденцию к увеличению в направлении южных районов, был продемонстрирован ранее (Zhang et al. 2008; Andeden et al. 2011). Такие генотипы могут иметь преимущество по урожайности в условиях более длинного периода вегетации, благодаря их более позднему созреванию, обусловленному чувствительностью к яровизации (Pugsley 1971; Stelmakh 1993). В соответствии с предыдущими данными, мы показали статистически значимое ($p < 0.001$) на 5-8 дней более позднее колошение гаплотипа *vrn-A1 VRN-B1a vrn-D1* по сравнению с дигенно-доминантным гаплотипом по *VRN-A1* и *VRN-B1* (Табл. 14; Рис. 44).

Табл. 14 Средние величины срока колошения для наиболее распространенных комбинаций аллелей *VRN-1* и *PPD-D1*

Гаплотипы		Число сортов	Среднее количество дней до колошения	95% доверительный интервал
<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1</i>	29	72.6	70.7-74.4
	<i>VRN-A1b vrn-B1 vrn-D1</i>	5	72.4	68.0-76.8
	<i>VRN-A1a VRN-B1a vrn-D1</i>	108	72.0	71.4-72.7
	<i>VRN-A1a VRN-B1c vrn-D1</i>	14	69.5	67.6-71.2
	<i>VRN-A1b VRN-B1a vrn-D1</i>	7	75.0	70.6-79.3
	<i>vrn-A1 VRN-B1a vrn-D1</i>	45	78.7	76.5-80.8
	<i>vrn-A1 vrn-B1 VRN-D1a</i>	4	75.2	70.1-80.3
<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1 VRN-B1a vrn-D1</i>	5	76.2	73.0-79.4
	<i>vrn-A1 vrn-B1 VRN-D1a</i>	5	72.0	69.7-74.2

Аллель *VRN-A1b* был ранее найден как у тетраплоидных, так и у гексаплоидных образцов, со сравнительно низкой частотой (Yan et al. 2004a; Iqbal et al. 2007; Santra et al. 2009; Andeden et al 2011). Мы не наблюдали значительных различий по времени колошения между генотипами, содержащими *VRN-A1b* и содержащими аллель *VRN-A1a* (Табл. 14).

Подобно *VRN-A1b*, доминантный аллель *VRN-D1a* имеет низкую представленность в европейской коллекции сортов (Табл. 13). Он был найден, главным образом, в южных районах, где он обычно сочетается с *PPD-D1a* (см. выше). Как показано ранее, *VRN-D1a* является преобладающим аллелем у яровых генотипов пшеницы, адаптированных к тропическим и субтропическим районам (Iwaki et al. 2001; Zhang et al. 2008; Eagles et al. 2010).

Таким образом, комбинация фотопериод-чувствительного аллеля *PPD-D1b* с двумя доминантными аллелями по *VRN-A1* и *VRN-B1* представляет наиболее распространенный генотип яровой пшеницы для большей части Европы, за исключением южных районов, где моногенно-доминантные по *VRN-B1* (*VRN-D1*) генотипы получили преимущество, обеспечивая более позднее колошение в условиях более продолжительного периода вегетации.

4.3.3. Ассоциированные с геном VRN-1 предпосылки ярового образа жизни у тетраплоидных пшениц и их диплоидных предшественников

Большинство дикорастущих видов Triticeae, как диплоидных, так и полиплоидных, являются озимыми, что указывает на то, что рецессивный ген *VRN-1* представляет предковую, первоначальную форму гена. В то же время, многие культивируемые яровые полиплоидные пшеницы содержат, по крайней мере, один доминантный аллель *VRN-1* (Goncharov 1998). Возникает вопрос: были ли унаследованы эти аллели от диплоидных доноров-предшественников, или же они появились уже после гибридизации и возникновения аллополиплоидов? В первом случае можно было бы утверждать, что механизмы яровизации, обеспечившие широкую адаптацию полиплоидов, начали формироваться еще у диплоидных предков пшеницы.

Предыдущие исследования аллельного разнообразия *VRN-1* у дикорастущих видов *Triticum* были ограничены либо небольшим количеством анализируемых образцов (Yan et al. 2003; Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005; Dubcovsky et al. 2006), либо использованием одного регуляторного

района (промотор *VRN-1*) в качестве маркера (Golovnina et al. 2010). Нами была сделана попытка систематического исследования этих видов с использованием обоих регуляторных районов *VRN-1* в качестве маркеров. С этой целью был отобран широкий набор образцов, представляющих дикорастущие тетраплоидные виды: *T. dicoccoides* и *T. araraticum* вместе с культурным производным последнего - *T. timopheevii*, а также диплоидные виды - предполагаемые доноры А- и В(Г)- геномов полиплоидных пшениц (Табл. 3 приложения).

4.3.3.1. Диплоидные виды- предшественники А- и В- геномов

CAPS-маркер, разработанный нами к промоторному району *VRN-1*, позволил обнаружить 3 наиболее распространенных аллельных варианта у диплоидов, не прибегая к широкомасштабному секвенированию (Рис. 45). Рецессивный аллель *VRN-A1* был преобладающим среди образцов *T. monosocum* и *T. boeoticum* (Табл. 3 приложения; Табл. 10). Двадцать образцов *T. boeoticum* содержали аллель *VRN-A1h*, который отсутствовал у *T. monosocum*. Мы обнаружили ранее охарактеризованный аллель *VRN-A1f1* (Рис. 46) в 4-х образцах *T. monosocum* (Табл. 3 приложения; Табл. 10).

Все образцы *T. urartu* имели специфический паттерн рестрикции с использованием эндонуклеазы *Msp I*, позволяя идентифицировать *T. urartu* на фоне других диплоидных видов (Рис. 45b). Секвенирование позволило определить, что соответствующий аллель *VRN-A1u* высоко-гомологичен известным аллелям *VRN-A1* полиплоидных видов пшеницы. Последние аллели содержат инсерцию 8 пн, которая отсутствует в соответствующих последовательностях диплоидов (Рис. 46, 47), за исключением единственной ранее изученной последовательности *T. urartu* (GQ451737). Мы обозначили этот аллель как *VRN-A1u'*, предполагая, что он происходит от основного аллеля *VRN-A1u* *T. urartu*, и, в дальнейшем, был унаследован полиплоидными потомками с А-геномом, включая *T. dicoccoides* (Табл. 3 приложения).

Ранее, были разработаны молекулярные маркеры для идентификации крупных делеций в 1-м интроне, влияющих на чувствительность к яровизации (Fu et al. 2005). С использованием этих, а также наших собственных маркеров (Табл. 5) мы обнаружили две крупные мутации, возникшие на различных стадиях эволюции диплоидных видов (Рис. 48, 49). Инсерция 0.5 тпн вероятно возникла относительно недавно, в ходе эволюции *T. monococcum*, поскольку она была обнаружена только у некоторых образцов данного вида (Табл. 3 приложения). Делеция 1.4 тпн, по всей видимости, произошла у предшественника *T. urartu*, после его дивергенции от *T. boeoticum*. Оценка времени дивергенции *T. boeoticum* и *T. urartu* составляет 570 000 лет, тогда как время дивергенции *T. monococcum* и *T. boeoticum*- 290 000 лет (Middleton et al. 2014). Кроме *T. dicoccoides*, делеция 1.4 тпн характерна и для других полиплоидных видов с А-геномом.

Наряду с диплоидными видами А-генома, нами проанализирован вид *Ae. speltoides*, который рассматривается как наиболее вероятный предшественник В-генома на основании результатов анализа ряда ядерных и хлоропластных генов (Dvorak and Zhang 1990; Kilian et al. 2007; Golovnina et al. 2007). Нами был показан относительно высокий уровень дивергенции последовательностей промоторного района *VRN-1* у данного диплоидного вида, относительно аналогичных последовательностей полиплоидных видов линий Emmer и Timopheevii (см. далее). Указанная дивергенция, по-видимому, затронула и сайты отжига специфических праймеров, что привело к необходимости подбора других комбинаций праймеров для маркирования регуляторных районов *VRN-B1* гена. В тоже время, несмотря на дивергенцию близлежащих последовательностей, основные регуляторные сайты промоторного района (Рис. 46), а также размер фрагмента 1-го интрона, служащего в качестве маркера рецессивной формы гена (Рис. 48; Табл. 5), оказались без существенных изменений у *Ae. speltoides* по сравнению с полиплоидными видами. Консервативная структура *VRN-1* локуса, установленная нами на выборке образцов данного вида из разных

регионов, оставляет вопрос о генетических детерминантах ярового образа жизни у *Ae. speltooides* открытым. Следует отметить, что поиск этих детерминантов осложняется недостатком информации о распространенности яровых форм у данного вида.

Таким образом, анализ как промоторного района, так и первого интрона гена *VRN-1* у диплоидных видов А-генома позволил нам обнаружить видо-специфичные аллели, включая *VRN-A1f1* и *VRN-A1ins* для *T. monosocum*, *VRN-A1h* для *T. boeoticum* и *VRN-A1u* для *T. urartu*. Часть этих аллелей были ассоциированы у образцов- их носителей с признаком нечувствительности к яровизации для перехода в стадию колошения. Структурное сходство рецессивного аллеля *VRN-A1u* с соответствующими аллелями полиплоидных видов пшеницы подтвердило ранее полученные данные, представляющие *T. urartu* в качестве донора А-генома у полиплоидов (Chapman et al. 1976; Dvorak et al. 1993). Анализ полиморфизма *VRN-1* локуса у *Ae. speltooides*, предполагаемого донора В-генома, не выявил каких-либо изменений в основных регуляторных районах, которые могли бы обуславливать яровой тип развития.

4.3.3.2. Начало формирования нового набора доминантных аллелей *VRN-1* у *T. dicoccoides*

Дикая пшеница *T. dicoccoides* как вид имеет возраст примерно 360 000 лет, и возникла в результате спонтанной гибридизации, имевшей место в районе “Плодородного Полумесяца” (Fertile Crescent),- зоны активного земледелия Среднего Востока (Dvorak and Akhunov 2005). *T. dicoccoides* принадлежит к первым злаковым растениям, одомашненным человеком и именно этот этап доместикации заложил основу для последующей эволюции культурной полиплоидной пшеницы (Ozkan et al. 2011).

Используя тот же самый подход, что и в случае диплоидных видов, мы выявили два ранее описанных аллеля *VRN-A1b* и *VRN-A1d* с мутациями в промоторном районе у *T. dicoccoides* (Рис. 45, 46; Табл. 10). Эти аллели

встречаются у различных полиплоидных пшениц, как тетра-, так и гексаплоидных, однако, они не были обнаружены у диплоидных пшениц (Yan et al. 2004a; Golovnina et al. 2010). Наше и другие исследования показали отсутствие доминантного аллеля *VRN-A1a* с инсерцией в промоторном районе мобильного элемента типа “foldback” среди образцов *T. dicoccoides*. Указанный аллель является одним из самых распространенных среди аллелей гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (Yan et al. 2004a; Santra et al. 2009; Shcherban et al. 2012; Shcherban et al. 2015a) и, вероятно, впервые появился у тетраплоидной пшеницы *T. dicoccum* (ВБАА), произошедшей от *T. dicoccoides* (Golovnina et al. 2010).

ПЦР-анализ района 1-го интрона обнаружил аллель *VRN-A1L* в 3-х образцах *T. dicoccoides* (Fig. 48, 49; Табл. 10). Этот аллель с крупной делецией в интроне 1 весьма распространен среди культурных яровых образцов тетраплоидного вида *T. durum* (Fu et al. 2005; Oliveira et al. 2012). *VRN-A1L* также не был найден у диплоидных видов-предшественников геномов пшеницы.

В отличие от *VRN-A1*, локус *VRN-B1* у *T. dicoccoides* проявлял меньшее разнообразие как в составе промотора, так и внутри 1-го интрона, при этом не были выявлены какие-либо значительные мутации, типа инсерций или делеций, затрагивающие основные регуляторные сайты (Рис. 46). Ни одна из выделенных мутаций не была связана с яровым типом развития. У пшеницы туранской *T. turanicum* Jakubz. (ВБАА), имеющей более позднее происхождение, в одном из образцов была выявлена инсерция в промоторе *VRN-B1*- аллель *VRN-B1a* (Golovnina et al. 2010). Интересно, что эта инсерция гомологична инсерции в составе аллеля *VRN-A1a*, однако, расположена в другом месте- в позиции -100 пн от стартового кодона. Встройка ретротранспозона длиной 5.4 тпн в промоторе *VRN-B1* была обнаружена у тетраплоидной персидской пшеницы *T. carthlicum* Nevski, причем, в отличие от предыдущей инсерции в *VRN-B1a*, для этой встройки была подтверждена ассоциация с яровым образом жизни (Chu et al. 2011).

Различные, более мелкие мутации внутри промотора *VRN-B1* (замещения, делеции до 7 пн) были выявлены в некоторых образцах тетраплоидных видов пшеницы, включая *T. dicoccoides* (Muterko et al. 2016), однако, их связь с яровым образом жизни достоверно не установлена.

Как было показано выше, локус *VRN-A1* демонстрирует значительную вариацию в промоторе и меньшее разнообразие в 1-м интроне, за исключением аллелей *VRN-A1c* и *VRN-A1L*, распространенных среди гексаплоидных и тетраплоидных пшениц, соответственно (Fu et al. 2005; Oliveira et al. 2012; Shcherban et al. 2015a). В отличие от *VRN-A1*, для локуса *VRN-B1* характерно более широкое распространение аллелей, содержащих крупные делеции в 1-м интроне: аллели *VRN-B1a*, *b*, *c* (Shcherban et al. 2011; Santra et al. 2009; Milec et al. 2013). По данным Muterko et al. (2016), аллель *VRN-B1a* появился у тетраплоидных пшениц ветви Emmer, начиная с *T. durum*, тогда как *VRN-B1c* возник раньше, поскольку был обнаружен с помощью ПЦР в нескольких образцах *T. dicoccoides*. Однако, наши эксперименты, проведенные на большем количестве образцов, не подтверждают присутствия аллеля *VRN-B1c* у последнего вида. Мы предполагаем, что у некоторых образцов возможно появление ложноположительных результатов из-за неспецифической амплификации, что было доказано на одном из образцов с помощью секвенирования продукта ПЦР. Вероятней всего этот аллель появился после 2-го раунда аллополиплоидизации, так как, кроме мягкой пшеницы *T. aestivum*, считается доказанным его наличие только у дикорастущей гексаплоидной пшеницы *T. spelta* L. (Milec et al. 2013). Что касается аллеля *VRN-B1b*, то он пока выявлен только у мягкой пшеницы и в качестве его центра происхождения рассматривается Северная Америка (там же).

Таким образом, анализ *VRN-1* полиморфизма у полиплоидных пшениц линии Emmer указывает на то, что эта группа полиплоидных пшениц отличается по набору доминантных аллелей *VRN-1* от группы диплоидных видов-предшественников А- и В-геномов. Это указывает на независимое

возникновение ярового образа жизни у аллополиплоидов. У первого тетраплоидного вида *T. dicoccoides* этот признак возник, главным образом, в результате мутаций внутри локуса *VRN-A1* (его промотора или 1-го интрона). На более поздней стадии эволюции тетраплоидов линии Emmer получили распространение различные доминантные аллели по локусу *VRN-B1*, причем характер изменчивости данного локуса (преимущественно делеции в первом интроне) отличался от такового у *VRN-A1*. Пока не ясно, связано ли это различие с особенностями регуляции этих 2-х локусов, унаследованными от диплоидных предков, или же оно обусловлено процессом структурно-функциональной дивергенции гомеологов в ходе аллополиплоидизации.

4.3.3.3. Появление яровых форм *T. timopheevii* связано с инсерцией MITE в составе 1-го интрона *VRN-A1*

Полиплоидные пшеницы разделяются на две независимые эволюционные линии: Emmer (BBAA) и Timopheevii (GGAA), каждая из которых возникла в результате гибридизации между донором А-генома, *T. urartu* и различными формами *Ae. speltoides*, от которых произошли В- и G-геномы, соответственно. Как показано в предыдущей главе, появление яровых форм у *T. dicoccoides*, первого тетраплоида линии Emmer, было связано с мутациями, главным образом, делециями разной длины в промоторе и 1-м интроне локуса *VRN-A1*. Для того, чтобы изучить: с какими мутациями в составе генов *VRN-1* связано происхождение ярового образа жизни в группе Timopheevii, мы провели сравнительный анализ дикорастущего тетраплоидного вида *T. araraticum* с его domesticiрованным яровым производным- *T. timopheevii*.

Промоторный район *VRN-A1* у обоих тетраплоидных видов демонстрировал высокую степень консерватизма и был почти полностью идентичен ранее описанному промоторному району аллеля *VRN-A1f* *T. timopheevii* (Golovnina et al. 2010). Характерной чертой этого аллеля является

делеция 50 пн возле стартового кодона, которая, по-видимому, является специфичной для пшениц указанной группы (Рис. 51). В тоже время, мы выявили существенные изменения в составе 1-го интрона *VRN-A1*, которые включали: инсерцию МІТЕ 0.4 тпн и делецию 2.7 тпн, локализованные на расстоянии примерно 0.4 тпн и 3 тпн от старта интрона 1, соответственно. Недавно, Ivanicova et al. (2016) описали аллель *VRN-A1f-like*, содержащий обе мутации, в линии яровой мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала от *T. militinae* Zhuk.,- свободно омолачиваемой мутантной формы вида *T. timopheevii* (Feldman 2001). Эта линия характеризовалась измененным сроком колошения по сравнению с линией несущей рецессивный аллель *VRN-A1*. 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* от *T. araraticum*, поскольку она содержится как единственная мутация в 4-х образцах последнего вида. Наряду с этим, ни один из образцов *T. araraticum* не содержит инсерцию МІТЕ, которая присутствует во всех образцах *T. timopheevii*. При этом она либо комбинируется с первой мутацией (3 образца), либо существует независимо (1 образец).

Локус *VRN-G1* показывал незначительную вариацию между 2-мя видами, как по структуре промоторного района, так и 1-го интрона. Единственный модифицированный аллель *VRN-G1a*, содержащий инсерцию МІТЕ 0.2 тпн в промоторе, является общим для обоих видов (Табл. 11).

4.3.3.4. Влияние структуры гена *VRN-1* на тип развития у диплоидных и полиплоидных видов *Triticeae*

Диплоидные виды

Мы определили влияние аллелей *VRN-1* на тип развития у отобранных образцов, представляющих 3 диплоидных вида А-генома (Табл. 10). Из пяти тестированных образцов *T. monosocum*, четыре представляли яровой тип,

несмотря на присутствие интактного промотора в составе *VRN-A1*. У двух из них яровой образ жизни ассоциировался с инсерцией в 1-м интроне (*VRN-A1ins*). В целом, мы обнаружили аллель *VRN-A1ins* у 31% образцов *T. monosocum* (Табл. 3 приложения). Предыдущие данные подтвердили значение 1-го интрона в реакции на яровизацию и определении времени колошения (см. гл. 4.1.5.1).

Ранее было сделано предположение, что единственная нуклеотидная замена в CArG-боксе аллеля *VRN-A1f1* *T. monosocum* приводит к яровому типу развития, препятствуя взаимодействию с неизвестным репрессором, зависимым от фотопериода (Dubcovsky et al 2006). Однако, мы не можем дискриминировать эффект этого аллеля, поскольку в нашем материале он присутствует только в комбинации с *VRN-A1ins* (Табл. 10; Табл. 3 приложения).

У двух образцов *T. monosocum* и одном образце *T. boeoticum* яровой тип развития связан с рецессивным *VRN-A1* аллелем (*vrn-A1*; нет инсерции в интроне 1; Табл. 10). Предыдущие исследования генов яровизации у пшеницы выявили рецессивные мутации, блокирующие функцию гена *VRN-2* - репрессора цветения. Эти мутации приводят к конститутивной экспрессии *VRN-1*, независимо от аллельного статуса последнего (Distelfeld et al. 2009; Yan et al. 2004b; Dubcovsky et al 2006). Мы проанализировали 3 вышеупомянутых образца с использованием ранее разработанных молекулярных маркеров к гену *VRN-2* (Yan et al. 2004b) и обнаружили, что один из образцов *T. monosocum* содержит мутантный рецессивный аллель *VRN-2* (данные не представлены). Нам не удалось определить причину ярового образа жизни у 2-х других образцов (Табл. 10). В предыдущем исследовании, 6% образцов *T. monosocum* проявляли яровой тип развития, несмотря на генотип *vrn-1/Vrn-2* (Yan et al. 2004b). Основываясь на этих данных, можно предполагать, что, помимо *VRN-1* и *VRN-2*, другие гены могут оказывать влияние на чувствительность к яровизации у диплоидных форм пшеницы.

Из 4-х образцов *T. boeoticum*, содержащих аллель *VRN-A1h* и тестированных на выколашивание без яровизации, два были ярового типа, тогда как два других представляли озимый тип (Табл. 10). Golovnina с сотр. (2010) выдвинули гипотезу, что яровой тип развития у культурного *T. monosocum* ведет свое происхождение от дикорастущего предшественника-*T. boeoticum*, яровые образцы которого были отобраны человеком в процессе доместикации. Однако, отсутствие *VRN-1h* аллеля у *T. monosocum*, наряду с присутствием у последнего специфических аллелей, связанных с яровым образом жизни (*VRN-A1f1*, *VRN-A1ins*) позволяет выдвинуть альтернативную гипотезу селекции мутаций, возникших впервые у *T. monosocum*.

Мы не нашли яровых форм у *T. urartu* (Табл. 10). Ни один из образцов *T. urartu*, отобранных для анализа не имел изменений в промоторе или 1-м интроне *VRN-1*, которые могли бы обуславливать яровой тип развития (Табл. 3 приложения). Согласно Дорофееву и др. (1979), все формы *T. urartu* являются озимыми. По данным Гончарова (2002) - только 2% образцов *T. urartu* являются яровыми.

В отличие от предыдущего вида, вид *Ae. speltoides* - предшественник В- и G-геномов характеризуется большим количеством форм с яровым типом развития- 69%, согласно данным Гончарова (Goncharov 2002). Для этого вида был обнаружен дигенный контроль указанного признака (Гончаров и Коновалов, 1996). Наше исследование не выявило яровых форм среди изученных образцов *Ae. speltoides*, а также никаких значительных изменений в составе регуляторных районов локуса *VRN-1*. Следовательно, вопрос о генах, контролирующих яровой тип развития у *Ae. speltoides* требует дальнейших исследований.

Тетраплоидные виды

У *T. dicoccoides* мы обнаружили несколько аллелей *VRN-1*, которые являются широко распространенными среди культурных полиплоидных форм. Аллель *VRN-A1b* не всегда связан с яровым образом жизни у

гексаплоидной пшеницы (Pidal et al. 2009); в нашем исследовании он выявлен у трех озимых образцов *T. dicoccoides* (Табл. 10). Возможно это обусловлено тем, что делеция у данного аллеля не затрагивает непосредственно регуляторные сайты промотора, хотя и находится вблизи CArG-бокса (Рис. 46). Аллель *VRN-A1d* влияет на тип развития более существенно, возможно, благодаря дополнительной делеции, затрагивающей CArG-бокс. Этот аллель обуславливает яровой тип развития у всех образцов *T. dicoccoides*, изученных как в настоящей работе, так и в других исследованиях (Yan et al. 2004a; Golovnina et al. 2010). Аллель *VRN-A1L* ранее выявленный у ряда культурных тетраплоидных форм пшеницы также ассоциирован с яровым типом (Oliveira et al. 2012).

Представляется маловероятным, что детерминированный *VRN-A1* локусом яровой тип развития у *T. dicoccoides* был унаследован от древней диплоидной формы *T. urartu*, поскольку последний, как было отмечено выше, является преимущественно озимым видом и у него не выявлено соответствующих доминантных аллелей *VRN-1*. Kato et al. (1997) изучали географическое распределение различных форм *T. dicoccoides* и нашли, что распределение яровых форм ограничено, в основном, зонами с более теплым климатом. Эти авторы предположили, что яровой тип мог возникнуть из предшествующего озимого прототипа *T. dicoccoides* как адаптация к более теплым условиям произрастания, позволяющим переходить к стадии колошения без предварительной яровизации.

Наши данные указывают на то, что возникновение яровых форм в другой ветви полиплоидных пшениц- *Timopheevii* происходило независимо и с помощью другого механизма, хотя и есть некоторое сходство, а именно: в случае *T. timopheevii*, как и в случае *T. dicoccoides*, яровые формы были связаны с мутациями в *VRN-A1* локусе. Следует отметить, что первый вид, в отличие от *T. dicoccoides* имеет очень узкий ареал происхождения, от одной популяции, находящейся вблизи поселка Зандури в Западной Грузии (Mitrofanova et al. 2016). Благодаря этому, данный вид характеризуется

высокой морфологической и цитогенетической гомогенностью (Badaeva et al. 1994). Наши данные указывают на то, что этот вид мог возникнуть в результате доместикации яровой формы, имеющей инсерцию MITE-транспозона в составе 1-го интрона *VRN-A1* (см. предыдущую главу).

4.3.3.5. Роль транспозонов MITE в эволюции локусов *VRN-1*

Инсерция MITE длиной 222 пн обнаружена в составе VRN-бокса доминантного аллеля *VRN-A1a* (Yan et al. 2004a). В работе Yu et al. (2014) было показано, что данная инсерция в случае ее экспрессии в виде РНК может формировать стабильную шпилечную структуру. Из состава мягкой пшеницы была изолирована микроРНК, гомологичная MITE *VRN-A1a* (TamiR1123). В этой же работе было показано, что количество TamiR1123 повышено в изогенной линии, содержащей аллель *VRN-A1a*, по сравнению с линией содержащей рецессивный аллель *vrn-A1* и снижается под влиянием низкой температуры или короткого светового дня. На основе корреляции с уровнем транскрипции аллеля *VRN-A1a* предполагается, что TamiR1123 и мРНК *VRN-A1a* считываются как единый транскрипт с промотора, находящегося до инсерции или на ее 5'-фланкирующем сайте “ТТАААААСС”) (Рис. 58). Пока не ясно, - каким образом эта микроРНК может модулировать экспрессию *VRN-A1*? Один из механизмов предполагает прямое действие микроРНК на промотор гена. Другим возможным механизмом может быть эпигенетический, уже упомянутый выше в связи с мутациями в 1-м интроне *VRN-1*. Так, важную роль в поддержании репрессированного состояния гена *FLC* арабидопсиса играет РНК, синтезируемая внутри интрона 1 (Heo and Sung, 2010). Данная РНК обеспечивает посадку PR2- репрессирующего комплекса белков, осуществляющего метилирование гистона H3 в определенных позициях, соответствующих неактивной форме гена (Bastow et al., 2004; DeLucia et al., 2008). Можно предположить, что с помощью подобного механизма микроРНК, синтезируемая в составе MITE *VRN-A1a*, способна активировать

ген *VRN-1*, модифицируя конформацию хроматина в области промотора. Третья гипотеза предполагает добавление альтернативного промотора, в качестве вероятного претендента для которого выступает указанная выше последовательность сайта-мишени, дублированная в результате инсерции. Аналогичный механизм характерен для *Mutator*-подобных элементов (MULE) (Lisch, 2002; Ferguson and Jiang, 2012).

Вторая инсерция MITE в области промотора *VRN-1*- инсерция длиной 215 пн в рецессивном аллеле *vrn-G1a*, несмотря на высокую гомологию с MITE *VRN-A1a* (92%), имеет совершенно другой по структуре сайт-мишень “СТССGCCCC” (Рис. 58). Этот сайт находится на расстоянии 100 пн от ATG- кодона, после предполагаемого промотора и CArG-бокса. Анализ вторичной структуры соответствующей молекулы РНК показал, что она не способна продуцировать микроРНК, гомологичную Tam1R1123. В отличие от *VRN-A1a*, аллель *vrn-G1a* не оказывает заметное влияние на чувствительность к яровизации.

Инсерция MITE длиной 424 пн в составе 1-го интрона доминантных аллелей *VRN-A1f-like* и *VRN-A1f-ins T. timopheevii* не имеет гомологии с двумя предыдущими инсерциями и не способна образовывать достаточно протяженную, стабильную шпилечную структуру в случае ее транскрипции в молекулу РНК. Тем не менее, она имеет очень сходную с MITE *VRN-A1a* последовательность сайта-мишени: “ТААААААТА”. Механизм влияния этой инсерции на экспрессию *VRN-A1* гена пока не ясен, хотя, возможно, он связан с эпигенетической модификацией хроматина (см. гл. 4.3.1).

Обнаружение МЭ класса MITE в составе *VRN-1* локусов подтверждает важную роль этих МЭ в инсерционном мутагенезе. Другие работы показывают, что эти транспозоны высоко распространены в геномах растений (Bureau, Wessler, 1992; 1994) и довольно часто ассоциированы с генами (Guermontprez et al., 2012). Большинство MITE являются делеционными производными и используют для своего перемещения транспозазу, кодируемую автономными элементами. Известно, что процесс

аллополиплоидизации, как разновидность стресса, способен индуцировать инсерции МЭ некоторых классов и семейств (Matzke and Matzke, 1998; Comai et al., 2000; Kashkush et al., 2003; Parisod et al., 2010). Наряду с этим, экспансия полиплоидов в различные экологические и климатические зоны создает разнообразие внешних факторов, которые также могут оказывать влияние на активность МЭ (Bennetzen, 2000). Все эти факторы ускоряют процесс генетической изменчивости, в том числе, в составе *VRN1* локусов, и создают обширный материал для селекции новых форм полиплоидных растений под действием естественного или искусственного отбора.

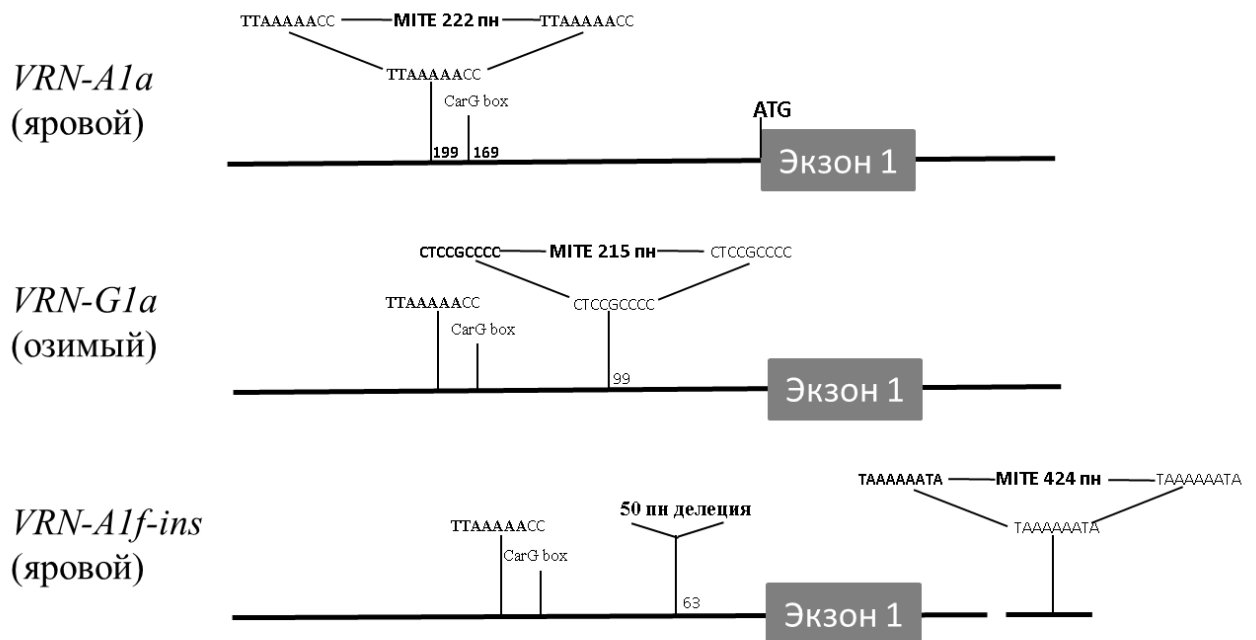


Рис. 58 Схемы различных аллелей *VRN-1* с инсерциями MITE транспозонов. Обозначены предполагаемые TATA-бокс (TTAAAAA) и CarG-бокс. Отмечены точные позиции (в пн) инделей и регуляторных сайтов от стартового кодона (Shcherban et al. 2016b).

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 амфиплоидов *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 амфиплоидов 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 плоидности. С использованием этой системы было впервые установлено, что формирование всего разнообразия аллелей этих локусов и их комбинаций, определяющих широкое распространение 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* риза 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 аллополиплоидных 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 ploидности.
- 5) Установлено, что происхождение яровых форм у полиплоидных видов пшеницы, начиная с первых дикорастущих тетраплоидных видов (BBAA/GGAA) 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.

б) 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бильданова Л.Л., Салина Е.А., Першина Л.А. Изучение беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов с использованием методов RAPD и RAMPD // Генетика. 2002. 38(3): 332-339.
2. Вахитов В.А., Никаноров Ю.М. Нуклеотидная последовательность большого повтора 5S ДНК у диплоидной пшеницы *Triticum monocossum* // Вуорpolymers and cell. 1989. 5(4): 58-62.
3. Гончаров Н.П., Коновалов А.А. Наследование глюкозофосфатизомеразы, остистости, опушения колоса и типа развития у *Aegilops speltoides* и *Ae. aucheri* // Генетика. 1996. 32(5): 656–662.
4. Добровольская О.Б. Характеристика пшенично-ржаных замещенных линий с использованием микросателлитных маркеров и изучение влияния отдельных хромосом ржи на показатели андрогенеза *in vitro* : Дис. на соиск. учен. степ. к.б.н. [Ин-т цитологии и генетики СО РАН].- Новосибирск, 2003, 201 с.
5. Леонова И.Н., Орловская О.А., Родер М.С. и др. Молекулярно–генетическое разнообразие интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*T. aestivum*/*T. timopheevii*) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. 17: 681–690.
6. Майстренко О.И. Использование цитогенетических методов в исследовании онтогенеза мягкой пшеницы // Онтогенетика высших растений. Кишинев: Штиинца, 1992. С. 98–114.
7. Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вестник ВОГИС. 2011. Т.15. С.382-397.
8. Тейф В.Б., Шкробков А.В., Егорова В.П., Крот В.И. Нуклеосомы в генной регуляции: теоретические подходы // Молекулярная биология. 2011. 45(6): 1–11.
9. Хемлебен В., Беридзе Т.Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 267–306.
10. Щербань А.Б., И.Г.Адолина, Е.А.Салина. Вклад *Tu3-gypsy*-ретротранспозона *Lila* в специфичность D-генома мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Молекулярная биология. 2012. 46(2): 1-10.

11. Щербань А.Б., Е.М. Сергеева, Е.Д.Бадаева, Е.А.Салина. Анализ изменений 5S рДНК у синтетических аллополиплоидов *Triticum* x *Aegilops* // Молекулярная биология. 2008. 42(4): 604-611.
- 12.Щербань А.Б., Хлесткина Е.К., Сергеева Е.М., Салина Е.А. Геномные изменения на ранних стадиях формирования аллополиплоида *Aegilops longissima* x *Triticum urartu* // Генетика. 2007.43(7): 963-970.
- 13.Adams K.L., Cronn R., Percifield R., Wendel J.F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003. 100(8): 4649–4654.
- 14.Adams K.L., Percifield R. and Wendel J.F. Organ-Specific Silencing of Duplicated Genes in a Newly Synthesized Cotton Allotetraploid // Genetics. 2004. 168(4): 2217–2226.
- 15.Adams K.L., Wendel J.F. Allele-Specific, Bidirectional Silencing of an Alcohol Dehydrogenase Gene in Different Organs of Interspecific Diploid Cotton Hybrids // Genetics. 2005. 171(4): 2139–2142.
- 16.Adonina I.G., Salina E.A., Pestsova E.G., Roder M.S. Transferability of wheat microsatellite to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome // Genome, 2005. 48: 959–970.
- 17.Aggarwal R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and Khush G.S. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers // Theor. Appl. Genet. 1996. 98: 1320–1328.
- 18.Akhunova A.R., Matniyazov R.T., Liang H., Akhunov E.D. Homoeolog-specific transcriptional bias in allopolyploid wheat // BMC Genomics. 2010. 11: 505.
- 19.Albertin W., Balliau T., Brabant P., Chèvre A-M., Eber F., Malosse C., Thiellement H. Numerous and Rapid Nonstochastic Modifications of Gene Products in Newly Synthesized *Brassica napus* Allotetraploids // Genetics. 2006. 173(2): 1101–1113.
- 20.Alix K. and Heslop-Harrison J.S. The diversity of retroelements in diploid and allotetraploid *Brassica* species // Plant Mol. Biol., 2004. 54: 895–909.

21. Alix K., Joets J., Ryder C.D., Moore J., Barker G.C., et al. The CACTA transposon *Bot1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // *Plant J.*, 2008. 56: 1030–1044.
22. Al-Kaff N., Knight E., Bertin I., Foote T., Hart N., Griffiths S. and Moore G. Detailed Dissection of the Chromosomal Region Containing the *Ph1* Locus in Wheat *Triticum aestivum*: With Deletion Mutants and Expression Profiling // *Ann Bot.* 2008. 101(6): 863–872.
23. Alkhimova O.G., Mazurok N.A., Potapova T.A., Zakian S.M., Heslop-Harrison J.S., Vershinin A.V. Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes // *Chromosoma*, 2004. 113:42–52.
24. Allen J.O., Fauron C.M., Minx P., Roark L., Oddiraju S., Lin G.N., Meyer L., Sun H., Kim K., Wang C., Du F., Xu D., Gibson M., Cifrese J., Clifton S.V. and Newton K.J. Comparisons Among Two Fertile and Three Male-Sterile Mitochondrial Genomes of Maize // *Genetics*. 2007. 177(2): 1173–1192.
25. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *Journal of Molecular Biology*, 1990. 215(3): 403–410.
26. Alvarez M.A., Tranquilli G., Lewis S., Kippes N., Dubcovsky J. Genetic and physical mapping of the earliness per se locus *Eps-Am1* in *Triticum monococcum* identifies *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* as a candidate gene // *Functional & Integrative Genomics*. 2016. 16: 365–382.
27. Ananthawat-Josson K., Heslop-Harrison J.S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 240. P. 151–158.
28. Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1998. V.95. P.13073-13078.
29. Andeden E.E., Yediay F.E., Baloch F.S., Shaaf S., Kilian B., Nachit M., Özkan H. Distribution of vernalization and photoperiod genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish bread wheat cultivars and landraces // *Cereal Res. Commun.*, 2011. 39: 352–364.

30. Anderson L.K., Hooker K.D. and Stack S.M. The distribution of early recombination nodules on zygotene bivalents from plants // *Genetics*, 2001. 159(3): 1259–1269.
31. Appels R., Baum B.R., Clarke B.C. The 5S DNA units of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Syst. Evol.* 1992. V.183. P.183-194.
32. Appels R., Dvořák J. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the Triticeae: Implications for the maintenance of homogeneity of a repeated gene family // *Theor. Appl. Genet.* 1982a. V.63. P.361-365.
33. Appels R., Dvořák J. The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species // *Theor. Appl. Genet.* 1982b. V.63. P.337-348.
34. Appels R., Gerlach W.L., Dennis E.S. et al. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals // *Chromosoma*. 1980. V. 78. P.293-311.
35. Appleford N.E., Evans D.J., Lenton J.R., Gaskin P., Croker S.J., Devos K.M., Phillips A.L., Hedden P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat // *Planta*. 2006. 223: 568-582.
36. Aguiar-Perecin M., de Vosa C.G. C-banding in maize II. Identification of somatic chromosomes // *Heredity*. 1985. 54: 37–42.
37. Asano Y. and Myodo H. Studies on crosses between distantly related species of lilies. 1. For the interstylar pollination technique // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 1977. 46: 59-65.
38. Baack E.J., Whitney K.D. and Rieseberg L.H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species // *New Phytol.* 2005. 167(2): 623-30.
39. Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae) // *Plant Syst. Evol.* 1994. 192: 117–145.

40. Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species // *Genome*. 1996a. 39 : 293-306.
41. Badaeva E.D., Gill B.S. Spontaneous chromosome substitutions in hybrids of *Triticum aestivum* with *T. araraticum* detected by C-banding technique // *Wheat Inf Service*. 1995. 80: 26–31.
42. Bancroft I. Insights Into the Structural and Functional Evolution of Plant Genomes Afforded by the Nucleotide Sequences of Chromosomes 2 and 4 of *Arabidopsis Thaliana* // *Yeast*. 2000. 17(1): 1–5.
43. Bao F., Azhakanandam S. and Franks R.G. *SEUSS* and *SEUSS-LIKE* Transcriptional Adaptors Regulate Floral and Embryonic Development in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2010. 152(2): 821–836.
44. Barbier P., Morishima H. and Ishihama A. Phylogenetic relationships of annual and perennial wild rice: Probing by direct DNA sequencing // *Theor. Appl. Genet*. 1991. 81: 693–702.
45. Bastow R., Mylne J.S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R.A., Dean C. Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation // *Nature*. 2004. 427: 164-167.
46. Baulcombe D. RNA silencing in plants // *Nature*, 2004, 431: 356–363.
47. Baum B.R., Johnson D.A. and Bailey L.G. Analysis of 5S rDNA units in the Triticeae: the potential to assign sequence units to haplomes. In: Jaradat, A.A. (Ed.), *Triticeae III*, 1998. pp. 85–96. Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire.
48. Baum B.R., Bailey L.G., Belyayev A., Raskina O., Nevo E. The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes — a test on cultivated wheat and wheat progenitors // *Genome*. 2004. 47(3): 590-599.
49. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape JW., Laurie D.A. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet*. 2007. 115:721–733.

50. Beaulieu J., Jean M., Belzile F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2009. 281(4): 421-35.
51. Bedbrook J.H., Jones J., O'Del M. A molecular distribution of telomeric heterochromatin in *Secale* species // *Cell*. 1980. V. 19. P. 545–560.
52. Belo A., Beatty M.K., Hondred D., Fengler K.A., Li B., et al. Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization // *Theor. Appl. Genet.* 2010. 120: 355–367.
53. Ben-Naim O., Eshed R., Parnis A., Teper-Bamnlker P., Shalit A., et al. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA // *Plant J.* 2006. 46: 462–476.
54. Bennett M.D., Leitch I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow // *Ann. Bot.* 2011. 107: 467–509.
55. Bennetzen J.L. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution // *Trends Microbiol.* 1996. V. 4. P. 347–353.
56. Bennetzen J.L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution // *Plant. Mol. Biol.* 2000b. 42: 251–269.
57. Bennetzen J.L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. 15: 621–627.
58. Bento M., Pereira H.S., Rocheta M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Polyploidization as a reaction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in triticale // *PLoSOne*. 2008. 1: 1–11.
59. Bentolila S., Alfonso A.A., and Hanson M.R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99: 10887–10892.
60. Biemont C. Within-species variation in genome size // *Heredity*. 2008. 101(4): 297-8.
61. Bird A.W., Yu D.Y., Pray-Grant M.G., Qiu Q., Harmon K.E., Megee P.C., Grant P.A., Smith M.M., Christman M.F. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair // *Nature*. 2002. 419(6905): 411-5.

62. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acid Res.* 1975. 7: 1513.
63. Blake N.K., Leffler B.R., Lavin M., Talbert L.E. Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat // *Genome.* 1999. 42(2): 351-60.
64. Blazquez M.A., R. Green, O. Nilsson, M.R. Sussman, and D. Weigel. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter // *Plant Cell.* 1998. 10:791–800.
65. Bowers J.E., Abbey C., Anderson S., Chang C., Draye X., Hoppe A.H., et al. A high density genetic recombination map of sequence-tagged sites for *Sorghum*, as a framework for comparative structural and evolutionary genomics of tropical grasses // *Genetics.* 2003. 165: 367-386.
66. Boyko E.V., Badaev N.S., Maximov N.G., Zelenin A.V. Regularities of genome formation and organization in cereals: I. DNA quantitative changes in the process of allopolyploidization // *Russ. J. Genetika.* 1988. 24:89–97.
67. Brandes A., Heslop-Harrison J.S., Kamm A., Kubis S., Doudrick R.L., Schmidt T. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-*copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms // *Plant Mol. Biol.* 1997. 33(1):11-21.
68. Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G.L., D'Amore R., Allen A.M., McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I., Gu Y., Huo N., Luo M.C., Sehgal S., Gill B., Kianian S., Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W.R., Hall A., Mayer K.F., Edwards K.J., Bevan M.W., Hall N. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing // *Nature.* 2012. 491(7426):705-10.
69. Bretagnolle F., Thompson J.F. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants // *New Phytol.* 129: 1-22.
70. Britten R.J., Kohne D.E. Repeated sequence in DNA // *Science.* 1968. 161: 529-540.

71. Brown G.G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P. et al. The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats // *Plant J.* 2003. 35: 262–272.
72. Brown B.D., Gentner B., Cantore A., Colleoni S., Amendola M., Zingale A., Baccarini A., Lazzari G., Galli C., Naldini L. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state // *Nat Biotechnol.* 2007. 25:1457–1467.
73. Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Orry A., Smith J.B. and Gale M.D. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 557–563.
74. Brysting A.K., Holst-Jensen A., Leitch I. Genomic origin and organization of the hybrid *Poa jemtlandica* (Poaceae) verified by genomic in situ hybridization and chloroplast DNA sequences // *Ann. Bot.* 2000. 85: 439–445.
75. Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust // *Acta Phytopathol. Entomol.* 2001. 36: 61–65.
76. Buggs R.J., Elliott N.M., Zhang L., Koh J., Viccini L.F., Soltis D.E. et al. Tissue-specific silencing of homoeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus* // *New Phytol.* 2010. 186: 175–183.
77. Bullrich L., M.L. Appendino, G. Tranquilli, S. Lewis and J. Dubcovsky Mapping of a thermo-sensitive earliness per se gene on *Triticum monococcum* chromosome 1A^m // *Theor. Appl. Genet.* 2002. 105: 585–593.
78. Bunning E. Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion // 1936. *Ber Dtsch Bot Ges.* 54: 590–607.
79. Bureau T.E., Wessler S.R. *Tourist*: a large family of inverted-repeat elements frequently associated with maize genes // *Plant Cell.* 1992. 4: 1283–1294.
80. Bureau T.E., Wessler S.R. *Stowaway*: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants // *Plant Cell.* 1994. 6: 907–916.

81. Capper R., Britt-Compton B., Tankimanova M., Rowson J., Letsolo B., Man S., Haughton M. and Baird D.M. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells // *Genes and Dev.* 2007. 21: 2495-2508.
82. Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L. and Campos I. To be or not to be in the nucleolus // *Nat. Cell Biol.* 2000. 2, E107-E112.
83. Carthew R. W., and E. J. Sontheimer Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs // *Cell.* 2009. 136: 642–655.
84. Castilho A., Heslop-Harrison J.S. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata* // *Genome.* 1995. 38: 91-96.
85. Cermeno M.C., Orellana J., Santos J.L., and Lacadena J.R. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops* // *Heredity.* 1984. 53: 603–611.
86. Cermeno M.C., and Lacadena J.R. Nucleolar organizer competition in *Aegilops*-rye hybrids // *Can. J. Genet. Cytol.* 1985. 27: 479–483.
87. Chagué V., Just J., Mestiri I., Balzergue S., Tanguy A.M., Huneau C., Huteau V., Belcram H., Coriton O., Jahier J., Chalhoub B. Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids // *New Phytol.* 2010. 187(4): 1181-94.
88. Chalhoub B., Belcram H. and Caboche M. Efficient cloning of plant genomes into bacterial artificial chromosome (BAC) libraries with larger and more uniform insert size // *Plant Biotechnol.* 2004. J. 2: 181–188.
89. Chantret N., Salse J., Sabot F., Rahman S., Bellec A., Laubin B., Dubois I., Dossat C., Sourdille P., Joudrier P., Gautier M.F., Cattolico L., Beckert M., Aubourg S., Weissenbach J., Caboche M., Bernard M., Leroy P., Chalhoub B. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) // *Plant Cell.* 2005. 17(4): 1033-45.
90. Chapman V., Miller T. E., Riley R. Equivalence of the A genome of bread wheat and that of *Triticum urartu* // *Genet. Res.* 1976. 27: 69–76.
91. Charles M., Belcram H., Just J., Huneau C., Viollet A., Couloux A., Segurens B., Carter M., Huteau V., Coriton O., Appels R., Samain S., Chalhoub B. Dynamics

- and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat // *Genetics*. 2008. 180(2): 1071-86.
92. Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes // *Nature*. 1994. 371: 215–220.
93. Chaudhary B., Flagel L., Stupar R.M., Udall J.A., Verma N., Springer N.M. et al. Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*) // *Genetics*. 2009. 182: 503–517.
94. Chen Z.J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor // *Trends Plant Sci*. 2010. 15: 57–71.
95. Chen Z.J., Comai L., Pikaard C.S. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1998. 95(25): 14891-6.
96. Chen Z. J., J. Wang L. Tian H.-S. Lee J. J. Wang M. Chen J. J. Lee C. Josefsson A. Madlung B. Watson J. C. Pires Z. Lippman, M. Vaughn, V. Colot, R.W. Doerge, R. A. Martienssen, L. Comai, and T. C. Osborn The development of an *Arabidopsis* model system for genome-wide analysis of polyploidy effects // *Biol. J. Linn. Soc*. 2004. 82: 689-700.
97. Chen A., C. Li, W. Hu, M. L. Lau, H. Lin et al. PHYTOCHROME C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long day photoperiod // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. 111(28): 10037–10044.
98. Chen Z. J. and Z. Ni Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids // *BioEssays*. 2006. 28: 240-252.
99. Chen Z. J., Scheffler B. E., Dennis E., Triplett B. A., Zhang T., Chen X., Stelly D. M., Rabinowicz P. D., Town C. D., Arioli T., Brubaker C., Cantrell R. G., Lacape J. M., Ulloa M., Chee P., Gingle A. R., Haigler C. H., Percy R., Saha S., Wilkins T., Wright R. J., Van Deynze A., Zhu Y., Yu S., Guo W., Abdurakhmonov I., Katageri I., Ananda-Kumar P., Rahman M., Yusuf Zafar Y., Yu J. Z., Kohel R. J., Wendel J. F., and Paterson A. H. Toward sequencing cotton (*Gossypium*) genomes // *Plant Physiol*. 2007. 145:1303-1310.

- 100.Chen Z.J. and Pikaard C.S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance // *Genes Dev.* 1997a. 11: 2124–2136.
- 101.Chen Z.J. and Pikaard C.S. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/ silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997b. 94: 3442–3447.
- 102.Chu C.G., Tan C.T., Yu G.T., Zhong S., Xu S.S., Yan L. A novel retrotransposon inserted in the dominant *Vrn-B1* allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) // *G3.* 2011. 1(7): 637-645.
- 103.Civardi L., Xia Y.J., Edwards K., Schnable P.S., Nikolau B.J. The relationship between the genetic and physical distances of the cloned *al-sh2* interval of the *Zea mays* L. genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. 91: 8268–8272.
- 104.Cockram J., Chiapparino E., Taylor S.A., Stamati K., Donini P., Laurie D.A., O'Sullivan D.M. 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. 115: 993–1001.
- 105.Comadran J., Kilian B., Russell J., Ramsay L., Stein N., Ganal M. et al. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley // *Nat.Genet.* 2012. 44(12): 1388-1392.
- 106.Comai L., Tyagi A.P., Lysak M.A. FISH analysis of meiosis in *Arabidopsis* allopolyploids // *Chromosome Res.* 2003. 11: 217–226.
- 107.Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploidy // *Nat. Rev. Genet.* 2005. 6: 836–846.
- 108.Comai L., A. P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S. H. Reynolds et al. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids // *Plant Cell.* 2000. 12: 1551–1568.

109. Copenhaver G.P., Pikaard C.S. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4 // *Plant J.* 1996. 9: 259-272.
110. Cordesse F., Cooke R., Tremousaygue D., Grellet F., Delseny Cordesse M. et al. Fine Structure and Evolution of the rDNA Intergenic Spacer in Rice and Other Cereals // *J. Mol. Evol.* 1992. 36: 369-379.
111. Costa L. M., Yuan J., Rouster J., Paul W., Dickinson H., and Gutierrez-Marcos J. F. Maternal control of nutrient allocation in plant seeds by genomic imprinting // *Curr. Biol.* 2012. 22: 160–165.
112. Cox A.V, Bennett M.D, Dyer T.A. Specific 5S ribosomal RNA primers for plant species identification in admixtures // *Theoret. Appl. Genet.* 1992. 83: 684.
113. Crombach A. and Hogeweg P. Chromosome Rearrangements and the Evolution of Genome Structuring and Adaptability // *Mol. Biol. and Evol.* 2007. 24(5):1130-9.
114. Cuadrado A., Jouve N. Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *secale* // *J Hered.* 2002. 93: 339-345.
115. Cui L., P. K. Wall, J. H. Leebens-Mack, B. G. Lindsay, D. E. Soltis, J. J. Doyle, P. S. Soltis, et al. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants // *Genome Research.* 2006. 16: 738–749.
116. Cullis C.A. Mechanisms and Control of Rapid Genomic Changes in Flax // *Ann. Bot.* 2005. 95(1): 201–206.
117. Daboussi M., Capy P. Transposable elements in filamentous fungi // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. V. 57. P. 275–299.
118. Dadejova M., Lim K.Y., Souckova-Skalicka K., Matyasek R., Grandbastien M.A., Leitch A. et al. Transcription activity of rRNA genes correlates with a tendency towards intergenomic homogenization in *Nicotiana* allotetraploids // *New Phytol.* 2007. 174: 658–668.
119. Danyluk J., Kane N.A., Breton G., Limin A.E., Fowler D.B., Sarhan F. *TaVRT-1*, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals // *Plant Physiol.* 2003. 132: 1849–1860.

120. Delseny M., Laroche M., Penon P. Methylation pattern of radish (*Raphanus sativus*) nuclear ribosomal RNA genes // *Plant Physiol.* 1984. 76:627–632.
121. De Lucia F., Crevillen P., Jones A.M., Greb T. et al. A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. 105: 16831-16836.
122. Des Marais D.L., Rausher M.D. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene // *Nature.* 2008. 454: 762–765.
123. Devos K. M., Brown M., Bennetzen J. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis* // *Genome Research.* 2002. 12: 1075-1079.
124. Diallo A.O., Agharbaoui Z., Badawi M.A., Ali-Benali M.A., Moheb A., Houde M., Diallo F.S. Transcriptome analysis of an *mvp* mutant reveals important changes in global gene expression and a role for methyl jasmonate in vernalization and flowering in wheat // *J. Exp. Bot.* 2014. 65(9): 2271–2286.
125. Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. 12: 178–184.
126. Drouaud J., Camilleri C., Bourguignon P.Y., Canaguier A., Berard A., Vezon D. et al. Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination ‘hot spots’ // *Genome Res.* 2006. 16: 106–114.
127. Dubcovsky J., Dvorák J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes // *Genetics.* 1995. 140: 1367-1377.
128. 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. 60: 469–480.
129. Dubcovsky J., M. Echaide E.F. Antonelli, and A.J. Lukaszewski Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and green bug resistance genes // *Crop Sci.* 1998. 38: 1655–1660.
130. Dubcovsky J., Dvorak J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication // *Science.* 2007. 316: 1862–1866.

- 131.Dvorak J. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In: Slinkard AE, ed. Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. 1998. (Saskatoon, Saskatchewan, Canada). University of Saskatchewan, University Extension Press: 8–11.
- 132.Dvorák J., Luo M.C., Yang Z.L. Restriction fragment length polymorphism and divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing aegilops species // *Genetics*. 1998. 148: 423-434.
- 133.Dvorak J., Zhang H.B., Kota R.S., Lassner M. Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species // *Genome*. 1989. 32: 1003–1016.
- 134.Dvorak J., Akhunov E.D. Tempos of deletions and duplications of gene loci in relation to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the *Aegilops-Triticum* alliance // *Genetics*. 2005. 171: 323-332.
- 135.Dvorak J. and Zhang H.B. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990. 87: 9640-9644.
- 136.Dvorak J., Akhunov E.D., Akhunov A.R., Deal K.R., Luo M.C. Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat // *Mol. Biol. Evol.*, 2006. 23: 1386-1396.
- 137.Eagles H.A., Cane K., Kuchel H., Hollamby G.J., Vallance N., Eastwood R.F., Gororo N.N., Martin P.J. Photoperiod and vernalization gene effects in southern Australian wheat *Crop Pasture // Sci.* 2010. 61: 721–730.
- 138.Earley K., Lawrence R.J., Pontes O., Reuther R., Enciso A.J., Silva M., et al. Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance // *Genes Dev.* 2006. 20: 1283-1293.
- 139.Efremova T.T., Arbuzova V.S., Leonova I.N., Makhmudova K. Multiple Allelism in the *Vrn-B1* Locus of Common Wheat // *Cereal Res. Communication*. 2011. 39(1): 12-21.

140. Emmott E., and Hiscox J.A. Nucleolar targeting: the hub of the matter // *EMBO Rep.* 2009; 10: 231–238.
141. Emsweller S.L., Stuart N.W. Use of growth regulating substances to overcome incompatibilities in *Lilium* // *Proc. Am.Soc. Hort. Sci.* 1948. 51: 581-589.
142. Fajkus J., Sykorova E., Leitch A.R. Telomeres in evolution and evolution in telomeres // *Chromosom Res.* 2005. 13: 469Y479.
143. Feldman M., Lupton F.G.H., and Miller T.E. Wheats. In *Evolution of Crop Plants*, 2nd ed, J. Smartt and N.W. Simmonds, eds (London: Longman Scientific), 1995. pp. 184–192.
144. Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A.A., Vega J.M. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes // *Genetics.* 1997. 147: 1381–1387.
145. Feldman M. Origin of cultivated wheat. In: Bonjean AP, Angus WJ, eds. *The world wheat book: a history of wheat breeding.* Paris, France: Lavoisier Publishing, 2001. pp: 3–56.
146. Feldman M., Levy A. A. Genome evolution in allopolyploid wheat—a revolutionary reprogramming followed by gradual changes // *J. Genet. Genomics.* 2009. 36: 511–518.
147. Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // *Cladistics.* 1989. 5: 164–166.
148. Feng Q., Zhang Y., Hao P., Wang S., Fu G., Huang Y., Li Y., Zhu J., Liu Y., Hu X., et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4 // *Nature.* 2002. 420: 316–320.
149. Ferguson A.A., Jiang N. Mutator-like elements with multiple long terminal inverted repeats in plants // *Comp. Funct. Genomics* 2012: 695827.
150. Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // *Annu. Rev. Genet.* 2007. 41: 331–368.

151. Flagel L.E., Udall J., Nettleton D., Wendel J. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution // BMC Biol. 2008. 6: 16.
152. Flagel L. E. and Wendel J. F. Evolutionary rate variation, genomic dominance and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation // New Phytol. 2010. 186: 184–193.
153. Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R. et al. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants // Nucl. Acids Res. 1992. 20: 3639–3644.
154. Flavell R.B. Amplification, deletion and rearrangement: Major sources of variation during species divergence // Genome Evolution / Eds Dover G.A., Flavell R.B. London: Acad. Press, 1982.
155. Flavell R.B. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1986. 312: 227-242.
156. Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B., Smith D.B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants // Biochem. Genet. 1974. 12: 257-269.
157. Flavell R.B., O'Dell M. Ribosomal RNA genes on homologous chromosomes of groups 5 and 6 in hexaploid wheat // Heredity. 1976. 37: 372-385.
158. Flavell R. B., Rimpau J., Smith D.B., O'Dell M., and Bedbrook J. The evolution of plant genome structure // NATO Adv. Study Inst. Ser. Ser. A Life Sci. 1979. 29: 35.
159. Flavell R.B., O'Dell M., Thompson W.F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat // J. Mol. Biol. 1988. 204: 523-534.
160. Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y.-L., Postlethwait J.H. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // Genetics. 1999. 151: 1531–1545.
161. Franken J., J.B.M. Custers and R.J. Bino Effects of temperature on pollen tube growth and fruit set in reciprocal crosses between *Cucumis sativus* and *C. metuliferus* // Plant Breed. 1988. 100: 150–153.

162. Fransz P., de Jong H. From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information // *Plant J.* 2011. 66: 4–17.
163. Frey M., Reinecke J., Grant S. et al. Excision of the *En/Spm* transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 4037–4044.
164. Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J., Hayes P., Dubcovsky J. Large deletions in the first intron of the *VRN-1* vernalization gene are associated with spring growth habit in barley and polyploid wheat // *Mol. Genet. and Genomics.* 2005. 273: 54–65.
165. Fujii S., Kazama T., Yamada M. and Toriyama K. Discovery of global genomic re-organization based on comparison of two newly sequenced rice mitochondrial genomes with cytoplasmic male sterility-related genes // *BMC Genomics.* 2010. 11: 209.
166. Fujii S. and Toriyama K. Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice // *Theor. Appl. Genet.* 2009. 111: 696–701.
167. Fujimoto R., Sugimura T., Fukai E., Nishio T. Suppression of gene expression of a recessive *SP11/SCR* allele by an untranscribed *SP11/SCR* allele in *Brassica* self-incompatibility // *Plant Molecular Biology.* 2006. 61(4): 577–587.
168. Fujimoto R., Kinoshita Y., Kawabe A., Kinoshita T., Takashima K., Nordborg M., Nasrallah M.E., Shimizu K.K., Kudoh H. and Kakutani T. Evolution and control of imprinted *FWA* genes in the genus *Arabidopsis* // *PLoS Genet.* 2008. 4: e1000048.
169. Fujimoto R.; Taylor J.M.; Sasaki T.; Kawanabe T.; Dennis E.S. Genome wide gene expression in artificially synthesized amphidiploids of *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* 2011. 77: 419–431.
170. Fujimoto R. and Nishio T. Identification of S haplotypes in *Brassica* by dot-blot analysis of *SP11* alleles // *Theor. Appl. Genet.* 2007. 106: 1433–1437.

171. Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez-Luy F., Leon E., Osborn T.C. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype // *Plant Cell*. 2007. 19: 3403–3417.
172. Gaeta R.T., Yoo S-Y., Pires J.C., Doerge R.W., Chen Z.J., Osborn T.C. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70mer oligo microarrays // *PLoS ONE*. 2009. 4: e4760.
173. Gaeta R.T., Pires J.C. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet // *New Phytol*. 2010. 186: 18–28.
174. Gale M.D., and K.M. Devos Comparative genetics in the grasses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. 95: 1971-1974.
175. Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape J.W. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat // *Theor. Appl. Genet*. 1995. 90: 1174–1179.
176. Gaut B.S. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses // *Genome Res*. 2001. 11: 55–66.
177. Gaut B.S., Doebley J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1997. 94: 6809–6814.
178. Gazzani S., Gendall A.R., Lister C., and Dean C. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions // *Plant Physiol*. 2003. 132: 1107–1114.
179. Gerlach W.L., and Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // *Nucleic Acid Res*. 1979. 7: 1869-1885.
180. Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes // *Nucleic Acids Res*. 1980. 8: 4851-4865.
181. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nature Reviews Genetics*. 2009. 10: 94–108.
182. Goldberg E.E., Kohn J.R., Lande R., Robertson K.A., Smith S.A., Iqbal B. Species Selection Maintains Self-Incompatibility // *Science*. 2010. 330: 493-495.

183. Golovnina K.A., Glushkov S.A., Blinov A.G., Mayorov V.I., Adkison L.R., Goncharov N.P. Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. // *Plant Syst. Evol.* 2007. 264: 195–216.
184. Golovnina K.A., Kondratenko E., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats // *BMC Plant Biology* 2010. 10:168.
185. Goncharov N.P. Genetic resources of wheat related species: the *Vrn* genes controlling growth habit (spring vs. winter) // *Euphytica*. 1998. 100: 371–376.
186. Goncharov N.P. Comparative genetics of wheats and their related species. Novosibirsk: Siberian University Press (In Russian); 2002, 251 pp.
187. Goncharov N.P. Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature // *Cereal Res. Comm.* 2004. 32: 323–330.
188. Goncharov N.P., Shitova I.P. Inheritance of growth habit in old local varieties and landraces of hexaploid wheat // *Rus. J. Genet.* 1999. 35: 467–473.
189. Goodrich J., Tweedie S. Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2002. 18: 707–746.
190. Goodwin T.J., Poulter R.T. A new group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons // *Mol. Biol. Evol.* 2004. 21:746–759.
191. Grant V. *Plant speciation*. 2d ed. 1981. Columbia Univ. Press, New York.
192. Greer E., Martin A.C., Pendle A., Colas I., Jones A.M.E., Moore G., Shaw P. The *Ph1* locus suppresses Cdk2-type activity during premeiosis and meiosis in wheat // *The Plant Cell*. 2012. 24: 152–162.
193. Gribbon B.M., Pearce S.R., Kalendar R., Schulman A.H., Jack P., Kumar A., Flavell A.J. Phylogeny and transpositional activity of *Ty1-copia* group retrotransposons in cereal genomes // *Mol. Gen. Genet.* 1999. 261: 883–891.
194. Griffiths S., Sharp R., Foote T.N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moore G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat // *Nature*. 2006. 439: 749–752.

195. Grover C.E., Kim H., Wing R.A., Paterson A.H., Wendel J.F. Incongruent patterns of local and global genome size evolution in cotton // *Genome Res.* 2004. 14(8): 1474–1482.
196. Grover C.E., Kim H., Wing R.A., Paterson A.H., Wendel J.F. Microcolinearity and genome evolution in the *AdhA* region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*) // *Plant J.* 2007. 50(6): 995–1006.
197. Gindullis F., Dechyeva D., and Schmidt T. Construction and characterization of a BAC library for the molecular dissection of a single wild beet centromere and sugar beet (*Beta vulgaris*) genome analysis // *Genome.* 2001. 44: 846-55.
198. Goff S.A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.ssp. japonica) // *Science.* 2002. 296: 92-100.
199. Guermonprez H., Hénaff E., Cifuentes M. and Casacuberta J. MITEs, miniature elements with a major role in plant genome evolution. In *Topics in Current Genetics: Plant Transposable Elements* (Grandbastien, M.A. and Casacuberta, J.M., eds). Heidelberg/Berlin: Springer-Verlag, 2012. pp. 112–124.
200. Guerra M., Brasileiro-Vidal A. C., Arana P., Puertas M. J. Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae) // *Genetica.* 2006. 126: 33–41.
201. Guo M., Davis D., Birchler J.A. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series // *Genetics.* 1996. 142: 1349–1355.
202. Guo Z., Song Y., Zhou R., Ren Z., Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene // *New Phytol.* 2010. 185: 841–851.
203. Ha M., Kim E.D., Chen Z.J. Duplicate genes increase expression diversity in closely related species and allopolyploids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009a. 106: 2295–2300.
204. Ha M., Lu J., Tian L., Ramachandran V., Kasschau K.D., Chapman E.J., Carrington J.C., Chen X., Wang X.J., Chen Z.J. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. 106: 17835–17840.

- 205.Hackett C.A., Ellis R.P., Forster B.P., McNicol J.W., Macaulay M. Statistical analysis of a linkage experiment in barley involving quantitative trait loci for height and ear-emergence time and two genetic markers on chromosome 4 // *Theor. and Appl. Genet.* 1992. 85: 120-126.
- 206.Haig D., Westoby M. Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1991. 333: 1–13.
- 207.Han F.P., Fedak G., Guo W., and Liu B. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat(pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids // *Genetics.* 2005. 170: 1239–1245.
- 208.Hanson M.R. and S. Bentolila Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development // *Plant Cell.* 2004. 16: 154-169.
- 209.Harlan J.R., De Wet J.M.J., On Ò. Winge and a prayer: the origins of polyploidy // *The Bot. Rev.* 1975. 41: 361-690.
- 210.Hazzouri R.M., Mohajer A., Dejak S.I., Otto S.P., Wright S.I. Contrasting patterns of transposable-element insertion polymorphism and nucleotide diversity in autotetraploid and allotetraploid *Arabidopsis* species // *Genetics.* 2008. 179: 581-592.
- 211.He P., Friebe B.R., Gill B.S., and Zhou J.M. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat // *Plant Mol. Biol.* 2003. 52: 401–414.
- 212.He Y., and Amasino R.M. Role of chromatin modification in flowering-time control // *Trends Plant Sci.* 2005. 10: 30–35.
- 213.Hegarty M.J., and Hiscock S.J. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies // *New Phytol.* 2005. 165: 411–423.
- 214.Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B. Low temperature and daylength cues are integrated to regulate *FLOWERING LOCUS T* in barley // *Plant Physiol.* 2008. 147: 355–366.

215. Heo J. and Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA // *Science*. 2010. 331: 76-79.
216. Heslop-Harrison J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes // *Plant Cell*. 2000. 12: 617-636.
217. Heslop-Harrison J. S., Murata M., Ogura Y., Schwarzacher T. and Motoyoshi F. Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes // *Plant Cell*. 1999. 11: 31-42.
218. Heslop-Harrison J.S. and Maluszynska J. The molecular cytogenetics of *Arabidopsis*. In *Arabidopsis* (Meyerowitz, E.M. and Sommerville, C.R., eds). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. P. 63–87.
219. Heslop-Harrison J.S. and Schmidt T. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // *Trends Plant Sci*. 1998. 3: 195–199.
220. Heslop-Harrison J.S. and Schwarzacher T. Organisation of the plant genome in chromosomes // *Plant J*. 2011. 66: 18–33.
221. Hittinger C.T., Carroll S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch // *Nature*. 2007. 449: 677–681.
222. Hoffer P., Ivashuta S., Pontes O., Vitins A., Pikaard C., Mroczka A., Wagner N., Voelker T. Posttranscriptional gene silencing in nuclei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. 108: 409–414.
223. Hovav R., Udall J.A., Chaudhary B. et al. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. 105: 6191–6195.
224. Hu T.T., Pattyn P., Bakker E.G., Cao J., Cheng J.F., Clark R.M., et al. The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change // *Nature Genetics*. 2011. 43: 476–481.
225. Huang S., Sirikhachornkit A., Su X., Faris J., Gill B., et al. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99: 8133–8138.

- 226.Hunt L.A. Photoperiodic responses of winter wheats from different climatic regions // *Z. Pflanzenzüchtung*. 1979. 82: 70–80.
- 227.Iqbal M., A. Navabi, R. C. Yang, D. F. Salmon, and D. Spaner Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat // *Genome*. 2007. 50: 511—516.
- 228.Ishikawa R., Ohnishi T., Kinoshita Y., Eiguchi M., Kurata N., Kinoshita T. Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division // *Plant J*. 2011. 65: 798–806.
- 229.Islam-Faridi M. N., Worland A. J. and Law C. N. Inhibition of ear-emergence time and sensitivity to day-length determined by the group 6 chromosomes of wheat // *Heredity*. 1996. 77: 572–580.
- 230.Itabashi E., Iwata N., Fujii S., Kazama T., Toriyama K. The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein // *Plant J*. 2011. 65: 359–367.
- 231.Ivanicova Z., Jakobson I., Reis D., Safar J., Milec Z., Abrouk M., Dolezel J. Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Triticum militinae* // *New Biotech*. 2016. 33(5): 718–27.
- 232.Iwaki K., S. Haruna, T. Niwa, and K. Kato. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and the *Vrn* genotype // *Plant Breeding*. 2001. 120: 107-114.
- 233.Iwamoto M., Maekawa M., Saito A., Higo H., Higo K. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots // *Theor. Appl. Genet*. 1998. 97: 9-19.
- 234.Jackson S. D. Plant responses to photoperiod // *New Phytol*. 2009. 181: 517-531.
- 235.Jena K.K. and Kochert G. Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L // *Plant. Mol. Biol*. 1991.16: 831-839.
- 236.Jensen C.J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: JENSEN, CJ (Ed.). 1974. Haploids in higher plants: advances and potentials. Guelph:Univ. Guelph. p. 153-192.

- 237.Jensen-Seaman M. I., Furey T. S., Payseur B. A., Lu Y., Roskin K. M., et al. Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes // *Genome Res.* 2004. 14: 528–538.
- 238.Jiang J., Birchler J.B., Parrott W.A., and Dawe R.K. A molecular view of plant centromeres // *Trends Plant Sci.* 2003. 8: 570–575.
- 239.Jiang J. and Gill B.S. Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support diphyletic origin of polyploid wheats // *Chrom. Res.* 1994. 2: 59-64.
- 240.Johnston S.A. and Hanneman R.E. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species // *Science.* 1982. 217: 446–448.
- 241.Jones A. Unreduced pollen in a wild tetraploid relative of sweetpotato // *J. Amer. Soc. Horticult. Sci.* 1990. 115: 512-516.
- 242.Jones J.D.G., and Flavell R. The mapping of highly-repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale* // *Chromosoma.* 1982. 86: 595-612.
- 243.Josefsson C., Dilkes B., Comai L. Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization // *Curr. Biol.* 2006.16: 1322–1328.
- 244.Jung C., Müller A.E. Flowering time control and applications in plant breeding // *Trends Plant Sci.* 2009. 14: 563–573.
- 245.Jupe E.R., Zimmer E.A. Unmethylated regions in the intergenic spacer of maize and teosinte ribosomal RNA genes // *Plant Mol. Biol.* 1990. 14: 333–347.
- 246.Jurka J., Kapitonov V. V. PIFs meet Tourists and Harbingers: a superfamily reunion. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98: 12315–12316.
- 247.Kajikawa M., Okada N. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence // *Cell.* 2002. 111: 433–444.
- 248.Kane N.A., Danyluk J., Tardif G., et al. TaVRT-2, a member of the StMADS-11 clade of flowering repressors, is regulated by vernalization and photoperiod in wheat // *Plant Physiology.* 2005.138: 2354–2363.

- 249.Kang I.H., Steffen J.G., Portereiko M.F., Lloyd A., Drews G.N. The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2008. 20: 635–647.
- 250.Kapitonov V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. 98: 8714–8719.
- 251.Kashkush K., Feldman M. and Levy A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // *Genetics*. 2002. 160: 1651–1659.
- 252.Kashkush K., Feldman M. and Levy A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // *Nature Genet.* 2003. 33: 102–106.
- 253.Kato K., Miura H., Sawada S. Characterization of *QEet.ocs-5A.1*, a quantitative trait locus for ear emergence time on wheat chromosome 5AL // *Plant Breeding*. 2002. 121: 389–393.
- 254.Kazama T., Toriyama K. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice // *FEBS Lett*. 2003. 544: 99–102.
- 255.Kazama T., Nakamura T., Watanabe M., Sugita M., Toriyama K. Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice // *Plant J*. 2008. 55: 619–628.
- 256.Kellogg E. A., and R. Appels Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes are decoupled in diploid wheat relatives // *Genetics*. 1995. 140: 325–343.
- 257.Kenan-Eichler M., Leshkowitz D., Tal L., Noor E., Melamed-Bessudo C., et al. Wheat Hybridization and Polyploidization Results in Deregulation of Small RNAs // *Genetics*. 2011. 188: 263–272.
- 258.Khan N., Zhou S., Ramanna M.S., Arens P., Herrera J., Visser R.G.F., Van Tuyl J.M. Potential for analytic breeding in allopolyploids: An illustration from *Longiflorum* × *Asiatic* hybrid lilies (*Lilium*) // *Euphytica*. 2009. 166: 399–409.
- 259.Kinoshita T. Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants // *Genes Genet. Syst.* 2007. 82: 177–86.

260. Kilian A., Kleinhofs A. Cloning and mapping of telomere-associated sequences from *Hordeum vulgare* L. // Mol. Gen. Genet. 1992. 235: 153–156.
261. Kilian B., Özkan H., Deusch O., Effgen S., Brandolini A., Kohl J., Martin W., Salamini F. Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes // Mol. Biol. of Evol. 2007. 24: 217–227.
262. Kim S., Plagnol V., Hu T. T., Toomajian C., Clark R. M., et al. Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2007. 39: 1151–1155.
263. Kim J.H., Woo H.R., Kim J., Lim P.O., Lee I.C., Choi S.H., Hwang D., Nam H.G. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis* // Science. 2009. 323: 1053–1057.
264. Kimber G., Yen Y. Hybrids involving autotetraploid *Triticum umbellulatum* // Genome. 1989. 31: 1–5.
265. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. 16: 111–120.
266. Kimura R., Sato K., Fujimoto R., and Nishio T. Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa* // Plant J. 2002. 29: 215–223.
267. Kishii M., K. Nagaki and H. Tsujimoto Tandem repetitive sequences located in the centromeric region of common wheat *Triticum aestivum* chromosomes // Chromosome Res. 2001. 9: 417–428.
268. Kishii M., Tsujimoto H. Genus-specific localization of the *TaiI* family of tandem-repetitive sequences in either the centromeric or subtelomeric regions in Triticeae species (Poaceae) and its evolution in wheat // Genome. 2002. 45: 946–955.
269. Kit S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues // J Mol Biol. 1961. 3: 711–716.
270. Khlestkina E. K., Giura A., Röder M. S., Börner A. A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat // Euphytica. 2009. 165: 579–585.

- 271.Khrustaleva L.I., de Melo P.E., van Heusden A.W., Kik C. The integration of recombination and physical maps in a largegenome monocot using haploid genome analysis in a trihybrid *Allium* population // *Genetics*. 2005. 169: 1673–1685.
- 272.Kiss T., Balla K., Veisz O., Láng L., Bedö Z., Griffiths S., Isaac P., Karsai I. Allele frequencies in the *VRN-A1*, *VRN-B1* and *VRN-D1* vernalization response and *PPD-D1* photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) // *Mol. Breed*. 2014. 34: 297-310.
- 273.Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. Fertility restorer locus *Rfl* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12 // *Theor. Appl. Genet*. 2005. 111: 994-1012.
- 274.Köhler C., Mittelsten Scheid O., and Erilova A. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants // *Trends Genet*. 2010. 26: 142–148.
- 275.Köhler C., Wolff P., Spillane C. Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants // *Annual Review of Plant Biology*. 2012. 63, 18.1–18.22.
- 276.Kong Y., Zhou G., Yin Y., Xu Y., Pattathil S., Hahn M. G. Molecular analysis of a family of *Arabidopsis* genes related to galacturonosyltransferases // *Plant Physiol*. 2011. 155: 1791–1805.
- 277.Košner J., Pánková K. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn-1* and their effect on developmental stages of wheat // *Czech J. Genet. Plant Breed*. 2004. 40(2): 37-44.
- 278.Kosova K., I.T. Prasil, and P. Vitamvas The relationship between vernalization and photoperiodically-regulated genes and the development of frost tolerance in wheat and barley // *Biol. Plant*. 2008. 52:601–615.
- 279.Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function // *Cell*. 2007. 128: 693-705.
- 280.Kovarik A., Dadejova M., Lim K-Y., Chase M.W., Clarkson J.J., Knapp S., et al. Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics // *Annals of Botany*. 2008. 101: 815–823.

- 281.Kramerov D., Vassetzky N. Short retroposons in eukaryotic genomes // *Int. Rev. Cytol.* 2005. 247: 165–221.
- 282.Kubis S.E., Schmidt, T., and Heslop-Harrison J.S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes // *Ann. Bot.* 1998. 82S: 45–55.
- 283.Kubo T., Newton K. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations // *Mitochondrion.* 2008. 8: 5–14.
- 284.Kulikov A.M., and Vakhitov V.A. A new class of repeating elements in the intergenic spacer in diploid *Aegilops umbellulata* rDNA // *Mol. Biol.* 1995. 29: 1155–1160. [In Russian.]
- 285.Kulkosky J., Jones K. S., Katz R. A., Mack J. P. G. and Skalka A.M. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases // *Mol. and Cell. Biol.* 1992. 12: 2331-2338.
- 286.Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons. // *Annu. Rev. Genet.* 1999. 33: 479–532.
- 287.Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., and Nei M. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software // *Bioinformatics.* 2001. 17: 1–2.
- 288.Kumekawa N., Ohtsubo E., Ohtsubo H. Identification and phylogenetic analysis of *gypsy*-type retrotransposons in the plant kingdom // *Genes and Genetics Systems.* 1999. 74: 299–307.
- 289.Kuo H.F., Olsen K.M., Richards E.J. Natural variation in a subtelomeric region of *Arabidopsis*: implications for the genomic dynamics of a chromosome end // *Genetics.* 2006. 173: 401–417.
- 290.Lacadena J. R., Cermeno M. C., Orellana J., Santos J. L. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure // *Theor. Appl. Genet.* 1984. 67: 207–213.
- 291.Lagercrantz U., and D. Lydiate Comparative genome mapping in *Brassica* // *Genetics.* 1996. 144: 1903–1910.

- 292.Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., Fitzhugh W., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*. 2001. 409: 860-921.
- 293.Langridge P. Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis* // *Nature*. 1957.180: 36–37.
- 294.Laurie D.A., Pratchett N., Bezant J.H., Snape J.W. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter × spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross // *Genome*. 1995. 38:575–585.
- 295.Laurie D.A., Bennett M.D. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*: intergeneric, interspecific and intraspecific variation // *Heredity*. 1985. 55: 307–313.
- 296.Law C.N., Worland A.J. Genetic analysis of some flowering time and adaptive trait in wheat. In: Thomas H, Farrar JF (eds) *New Phytology*, Cambridge University Press: Cambridge. 1997. Vol 137, pp 19–28.
- 297.Law C. N., Worland A. J., Giorgi B. The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat // *Heredity*. 1975. 36: 49–584.
- 298.Lawrence R.J., Earley K., Pontes O., Silva M., Chen Z.J., Neves N., Viegas W., Pikaard C.S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance // *Mol. Cell*. 2004. 13: 599–609.
- 299.Le Corre V., Roux F., Reboud X. DNA polymorphism at the *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time // *Mol. Biol. Evol.* 2002. 19: 1261–1271.
- 300.Lee J.J., Hassan O.S., Gao W., Wei N.E., Kohel R.J., Chen X.Y., Payton P., Sze S.H., Stelly D.M., Chen Z.J. Developmental and gene expression analyses of a cotton naked seed mutant // *Planta*. 2006. 223: 418–432.
- 301.Leino M., Landgren M., Glimelius K. Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of *Arabidopsis* orfs in cytoplasmic male-sterile *Brassica napus* // *Plant J*. 2005. 426(1): 469–480.

302. Leitch I.J., Bennett M.D. Polyploidy in angiosperms // Trends Plant Sci. 1997. 2: 470–476.
303. Leitch I.J. and Bennett M.D. Genome downsizing in polyploid plants // Biological Journal of the Linnean Society. 2004. 82: 651-633.
304. Leitch I.J., Beaulieu J.M., Chase M.W., Leitch A.R., Fay M.F. Genome size dynamics and evolution in monocots // Journal of Botany. 2010: Article ID 862516, 18 pages.
305. Lelley T., Mahmoud A.A., Lein V. Genetics and cytology of unreduced gametes in cultivated rye (*Secale cereale* L.) // Genome 1987. 29: 635-638.
306. Leonova I.N., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Röder M.S., Börner A., Salina E.A. *Triticum aestivum*-*Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes // Czech J Genet Plant Breeding. 2011. 47: 444-449.
307. Levy A. A., Feldman M. The impact of polyploidy on grass genome evolution // Plant Physiol. 2002. 130: 1587–1593.
308. Levy A. A., Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization // Biol. J. Linn. Soc. Lond. 2004. 82: 607–613.
309. Lewis M.S., Pikaard D.J., Nasrallah M., Doelling J.H., Pikaard C.S. Locus-specific ribosomal RNA gene silencing in nucleolar dominance // PLoS One. 2007. 2: e815.
310. Li Y. C., Korol A. B., Fahima T. and Neno E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution // Mol. Biol. Evol. 2004. 21: 991–1007.
311. Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D., and Patel D.J. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF // Nature. 2006. 442: 91–95.
312. Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2 // Plant J. 2008. 55: 543–554.
313. Lim K.Y., Matyasek R., Lichtenstein C.P., Leitch A.R. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae* // Chromosoma. 2000. 109: 245–258.

- 314.Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R., Chase M.W., Clarkson J., Grandbastien M.A., et al. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years // *New Phytol.* 2007. 175: 56–763.
- 315.Lim K.Y., Soltis D.E., Soltis P.S., Tate J., Matyasek R., et al. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae) // *PLoS One.* 2008. 3: e3353.
- 316.Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998. 95: 12450-12455.
- 317.Lippman Z. and Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing // *Nature.* 2004. 431: 364–370.
- 318.Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H. and Schnable P.S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize // *Plant Cell.* 2001. 13: 1063–1078.
- 319.Long D., R. Lee et al. Potent effect of target structure on microRNA function // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. 14(4): 287-94.
- 320.Louis E. J. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* 1995. 11: 1553–1573.
- 321.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. 138: 2364–2373.
- 322.Lukens L.N., Pires J.C., Leon E., Vogelzang R., Oslach L., and Osborn T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids // *Plant Physiol.* 2006.140: 336–348.
- 323.Lynch M. The evolution of genetic networks by non-adaptive processes // *Nat. Rev. Genet.* 2007. 8: 803–813.
- 324.Lynch M., O’Hely M., Walsh B., Force A. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate // *Genetics.* 2001. 159: 1789–1804.

325. Lynch M., and A. Force The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. 2000. 154: 459-473.
326. Lysak M.A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K., Schubert I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. 103:5224–5229.
327. Lysak M.A., Koch M.A., Beaulieu J.M., Meister A., Leitch I.J. The dynamic ups and downs of genome size evolution in Brassicaceae // *Mol. Biol. Evol.* 2009. 26: 85–98.
328. Ma X.F., P. Fang, J.P. Gustafson Polyploidization-induced genome variation in triticale // *Genome*. 2004. 47: 839–848.
329. Ma J., and Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. 101: 12404–12410.
330. Ma X.F., J.P. Gustafson Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in Triticale // *Ann. Bot.* 2008. 101: 825–832.
331. Madlung A., Tyagi A.P., Watson B., Jiang H., Kagochi T., et al. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids // *Plant J.* 2005. 41: 221–230.
332. Madlung A., Masuelli R.W., Watson B., Reynolds S.H., Davison J., Comai L. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids // *Plant Physiol.* 2002. 129: 733–746.
333. Magness J.R., Markle G.M., Compton C.C. Food and feed crops of the United States. Interregional Research Project IR-4, 1971, IR Bul. 1 (Bul. 828 New Jersey Agr. Expt. Sta.). 1971. https://hort.purdue.edu/newcrop/CropInfoSources/Magness_info.htm.
334. Maluszynska J, Heslop-Harrison JS. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. 1991: 1: 159–166.
335. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 1982.

- 336.Marmagne A., Brabant P., Thiellement H., Alix K. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation // *New Phytol.* 2010. 186: 216–227.
- 337.Martin C., Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. 6: 838–849.
- 338.Martindill D.M., and P.R. Riley Cell cycle switch to endocycle // *Cell Cycle.* 2008. 7:17-23.
- 339.Martini G., M. O'Dell and R. B. Flavell Partial inactivation of wheat nucleolus organizers by the nucleolus organizer from *Aegilops umbellulata* // *Chromosoma.* 1982. 84: 687–700.
- 340.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. 52: 750–764.
- 341.Mattick J.S., Amaral P.P., Dinger M.E., Mercer T.R., Mehler M.F. RNA regulation of epigenetic processes // *Bioessays.* 2009. 31: 51–59.
- 342.Matzke A.J., Matzke M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. 1: 142–148.
- 343.Mayer C., Grummt I. Cellular stress and nucleolar function // *Cell Cycle.* 2005. 4: 1036–1038.
- 344.Mayer K.F., Rogers J., Doležel J., Pozniak C., Eversole K., Feuillet C., Gill B., Friebe B., et al. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome // *Science.* 2014. 345(6194):1251788.
- 345.Mayfield D., Chen Z.J., Pires J.C. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. 14: 174–178.
- 346.McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science.* 1984. 226(4676): 792–801.
- 347.McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Rogers W.J. and Gale M.D. Catalogue of gene symbols for wheat. In A.E. Slinkard, ed. *Proc. 9th Int. Wheat Genetics*

- Symp., vol. 5. University of Saskatchewan, Canada, University Extension Press. 1998. 235 pp.
348. McIntosh R. A., J. Dubcovsky, W. J. Rogers, C. F. Morris, R. Appels, and X. C. Xia Catalogue of gene symbols for wheat: 2010 Supplement. *Annu. Wheat Newsl.* 56, 273—282.
349. McIntyre C.L., Pereira S., Moran L.B., Appels R. New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat // *Genome*. 1990. 33: 635–640.
350. Mejia–Jimenez A., Munoz C., Jacobsen H.J., Roca W.M., Singh S.P. Interspecific hybridization between common and tepary beans: Increased hybrid embryo growth, fertility, and efficiency of hybridization through recurrent and congruity backcrossing // *Theor. Appl. Genet.* 1994. 88: 324–331.
351. Mestiri I., Chague V., Tanguy A.M., Huneau C., Huteau V., et al. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity // *New Phytol.* 2010. 186: 86–101.
352. Meyer E.H., Tomaz T., Carroll A.J., Estavillo G., Delannoy E., Tanz S.K., Small I.D., Pogson B.J., Millar A.H. Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night // *Plant Physiol.* 2009. 151: 603–619.
353. Michaels S.D. Flowering time regulation produces much fruit // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. 12: 75–80.
354. Michalak P. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions // *Heredity.* 2009. 102: 45–50.
355. Middleton C.P., Senerchia N., Stein N., Akhunov E.D., Keller B., Wicker T., Kilian B. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae Tribe // *PLoS ONE.* 2014. 9: e85761.
356. Miftahudin T., Scoles G.J., Gustafson J.P. Development of PCR-based codominant markers flanking the *Alt3* gene in rye // *Genome.* 2004. 47: 231–238.

- 357.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. 30(1): 317–323.
- 358.Milec Z., Sumikova T., Tomkova L., Pankova K. Distribution of different *Vrn-B1* alleles in hexaploid spring wheat germplasm // Euphytica. 2013. 192: 371–378.
- 359.Ming R., Hou S., Feng Y. et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* L.) // Nature. 2008. 452: 991–996.
- 360.Mitra R., Bhatia C.R. Repeated DNA sequences and polyploidy in cereal crops // DNA Systematics. V. II. Plants / Ed. Dutta S.K. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. P. 21–43.
- 361.Mitrofanova O., Badaeva E., Salina E.A. *T. timopheevii* and *T. zhukovskii*, the bread wheat cousins and their contribution to *T. aestivum* improvement. In: Bonjean AP, Angus WJ, VanGinkel M, editors. The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding (v.3). France: Tec & Doc Lavoisier; 2016. p. 1167–228. part 4, chapter 39.
- 362.Miura H., Worland A.J. Genetic control of vernalization, day-length response, and earliness per se by homoeologous group-3 chromosomes in wheat // Plant Breed. 1994. 113: 160–169.
- 363.Mockler T., Yang H.Y., Yu X.H., Parikh D., Cheng Y.C., Dolan S., Lin C.T. Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100: 2140-2145.
- 364.Morimoto R., Kosugi T., Nakamura C., Takumi S. Intragenic diversity and functional conservation of the three homoeologous loci of the KN1-type homeobox gene *Wknox1* in common wheat // Plant Mol. Biol. 2005. 57: 907-924.
- 365.Morris C.A., and D. Moazed Centromere assembly and propagation // Cell. 2007. 128: 647–650.
- 366.Motohashi R., K. Mochizuki, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo Structures and distribution of *p-SINE1* members in rice genomes // Theor. Appl. Genet. 1997. 95: 359–368.

367. Mudge S.R., Osabe K., Casu R.E., Bonnett G.D., Manners J.M. and Birch R.G. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species // *Planta*. 2009. 229: 549–558.
368. Mun J.H., Kwon S.J., Yang T.J., Seol Y.J., Jin M., Kim J.A., et al. Genome-wide comparative analysis of the *Brassica rapa* gene space reveals genome shrinkage and differential loss of duplicated genes after whole genome triplication // *Genome Biol*. 2009. 10:R111.
369. Murai K., Miyamae M., Kato H., Takumi S., and Ogihara Y. *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth // *Plant Cell Physiol*. 2003. 44: 1255–1265.
370. Murata M., Heslop-Harrison J.S. and Motoyoshi F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones // *Plant J*. 1997. V.12. P. 31–37.
371. Murfett J.M., Strabala T.J., Zurek D.M., Mou B., Beecher B., McClure B.A. S RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species // *The Plant Cell*. 1996. 8: 943–958.
372. 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 Biol*. 2016. 16 Suppl 1:65–81.
373. Mutti J. S., Sandhu D., Sidhu D., Gill K. S. Dynamic nature of a wheat centromere with a functional gene // *Mol. Breed*. 2010. 26: 177–187.
374. Nagaharu U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization // *Jpn. J. Bot*. 1935. 7: 389–452.
375. Nagaki K., Tsujimoto H., Isono K., Sasakuma T. Molecular characterization of a tandem repeat, *Afa* family, and its distribution among Triticeae // *Genome*. 1995. 38: 479–486.

376. Nagaki K., Tsujimoto H., Sasakuma T. H. Genome specific repetitive sequence, pEt2, of *Elimus trachycaulus* in part of *Afa* family of Triticeae // Genome. 1998. 41: 134–136.
377. Nagaki K., Kashihara K., Murata M. Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea* // Plant Cell. 2005. 17: 1886-1893.
378. Nakajima R., K. Noma H. Ohtsubo and E. Ohtsubo Identification and characterization of two tandem repeat sequences (*TrsB* and *TrsC*) and a retrotransposon (*RIRE1*) as genome- general sequences in rice // Genes Genet. Syst. 1996. 71: 373–382.
379. Naranjo T., Corredor E. Nuclear architecture and chromosome dynamics in the search of the pairing partner in meiosis in plants // Cytogenetic and genome research. 2008. 120: 320–330.
380. Naranjo T., Roca A., Goicoechea P.G. and Giraldez R. Arm homoeology of wheat and rye chromosomes // Genome. 1987. 29: 873-882.
381. Nasrallah M.E., Yogeewaran K., Snyder S., Nasrallah J.B. *Arabidopsis* species hybrids in the study of species differences and evolution of amphiploidy in plants // Plant Physiol. 2000. 124: 1605–1614.
382. Nasrallah J. B., P. Liu, S. Sherman-Broyles, R. Schmidt and M. E. Nasrallah Epigenetic mechanisms for breakdown of selfincompatibility in interspecific hybrids // Genetics. 2007. 175: 1965–1973.
383. Navashin H. Chromosome alterations caused by hybridization and their bearing upon certain general genetic problems // Cytologia. 1934. 5: 169-203.
384. Navratilova A., Koblizkova A., Macas J. Survey of extrachromosomal circular DNA derived from plantsatellite repeats // BMC Plant Biology. 2008. 8: 90.
385. Nei M. and Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. 76: 5269–5273.
386. Nelson D.E., Repetti P.P., Adams T.R., Creelman R.A., Wu J., et al. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved

- corn yields on water-limited acres // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. 104(42):16450-16455.
- 387.Neves N., Delgado M., Silva M., Caperta A., Morais-Cecilio L., Viegas W. Ribosomal DNA heterochromatin in plants // Cytogenetic and Genome Research. 2005. 109: 104–111.
- 388.Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids // Nature. 2009. 457: 327–331.
- 389.Nicolas S.D., Leflon M., Monod H., Eber F., Coriton O., Huteau V., Chevre A., Jenczewski E., Pattyn P., Gundlach H. et al. Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in *Brassica napus* haploids and hybrids // The Plant Cell. 2009. 21: 373–385.
- 390.Nimura M., Kato J., Horaguchi H., Mii M., Sakai K., Katoh T. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. // Breeding Science. 2006. 56: 303–310.
- 391.Ng R.K., Gurdon J.B. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription // Nature Cell Biol. 2008. 10: 102–109.
- 392.Noma K., Nakajima R., Ohtsubo H., Ohtsubo E. *RIRE1*, a retrotransposon from wild rice *Oryza australiensis* // Genes Genet. Syst. 1997. 72: 131–140.
- 393.Nomura T., Ishihara A., Yanagita R.C., Endo T.R., Iwamura H. Three genomes differentially contribute to the biosynthesis of benzoxazinones in hexaploid wheat // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. 102: 16490-16495.
- 394.Ohtsubo H., Umeda M. and Ohtsubo E. Organization of DNA sequences highly repeated in tandem in rice genomes // Jpn J. Genet. 1991. 66: 241–254.
- 395.Ohtsubo H., N. KumeKawa and E. Ohtsubo *RIRE2*, a novel gypsy-type retrotransposon from rice // Genes Genet. Syst. 1999. 74: 83–91.

- 396.Okamoto S., Odashima M., Fujimoto R., Sato Y., Kitashiba H., Nishio T. Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in S-locus genes // *Plant J.* 2007. 50: 391–400.
- 397.Oliveira H.R., Campana M.G., Jones H., Hunt H.V., Leigh F., Redhouse D.I., Lister D.L., Jones M.K. Tetraploid Wheat Landraces in the Mediterranean Basin: Taxonomy, Evolution and Genetic Diversity // *PLoS ONE.* 2012. 7(5): e37063.
- 398.Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S., Peacock J., 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. 106: 8386–8391.
- 399.Olson E.L., G. Brown-Guedira, D.S. Marshall, Y. Jin, M. Mergoum, I. Lowe, and J. Dubcovsky Genotyping of U.S. wheat germplasm for presence of stem rust resistance genes *Sr24*, *Sr36* and *SrIRSAmigo* // *Crop Sci.* 2010. 50: 668–675.
- 400.Osabe K., Kawanabe T., Sasaki T., Ishikawa R., Okazaki K. et al. Multiple mechanisms and challenges for the application of allopolyploidy in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. 13: 8696-8721.
- 401.Osborn T.C., Pires J.C., Birchler J.A., Auger D.L., Chen Z.J., Lee H.-S., Comai L., Madlung A., Doerge R.W., Colot V., and Martienssen R.A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids // *Trends Genet.* 2003. 19: 141–147.
- 402.Ostertag E. M., Kazazian H. H. Genetics: LINEs in mind // *Nature.* 2005. 435: 890–891.
- 403.Otto S.P., and Whitton J. Polyploid incidence and evolution // *Annu. Rev. Genet.* 2000. 34: 401–437.
- 404.Ozkan H., and Feldman M. Rapid cytological diploidization in newly formed allopolyploids of the wheat (*Aegilops–Triticum*) group // *Genome.* 2009. 52(11): 926–934.
- 405.Ozkan H., Levy A.A., and Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops–Triticum*) group // *Plant Cell.* 2001. 13: 1735–1747.

- 406.Özkan H., Tuna M., Kilian B., Mori N., Ohta S. Genome size variation in diploid and tetraploid wild wheats // *AoB Plants*. 2010. plq015.
- 407.Özkan H., Willcox G., Graner A., Salamini F., Kilian B. Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2011. 58: 11.
- 408.Pacher M., Schmidt-Puchta W., Puchta H. Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining // *Genetics*. 2007. 175: 21-29.
- 409.Paillard S., Schnurbusch T., Winzeler M., Messmer M., et al. An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2003. 107: 1235-1242.
- 410.Pardey P.G. A strategic look at global wheat production, productivity and R&D developments // *Czech J. Genet. Plant. Breed.* 2011. 47: 6-19.
- 411.Parisod C., Salmon A., Zerjal T., Tenailon M., Grandbastien M.A., Ainouche M. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* // *New Phytol.* 2009. 184: 1003–1015.
- 412.Parisod C., Alix K., Just J., Petit M., Sarilar V., et al. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes // *New Phytol.* 2010. 186: 37–45.
- 413.Parkin A.P., Sharpe A.G., Keith D.J., Lydiate D.J. Identification of the A and C genomes of the amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape) // *Genome*. 1995. 38: 1122–1131.
- 414.Parrott W.A., Smith R.R. Production of $2n$ pollen in red clover // *Crop Sci.* 1984. 24: 469-472.
- 415.Paterson A.H., Bowers J.E., Chapman B.A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. 101: 9903–9908.

- 416.Paux E., Roger D., Badaeva E., Gay G., et al. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B // *Plant J.* 2006. 48: 463–474.
- 417.Pearce S., Vanzetti L.S., and Dubcovsky J. Exogenous gibberellins induce wheat spike development under short days only in the presence of *VERNALIZATION1* // *Plant Physiol.* 2013. 163: 1433–1445.
- 418.Penner G. RAPD analysis of plant genome. In: Jahur PP, editor. *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1996. pp. 251-268.
- 419.Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H.L., and Poethig R.S. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* // *Genes & Dev.* 2004. 18: 2368-2379.
- 420.Pestsova E., Ganal M.W., Röder M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat // *Genome.* 2000a. 43: 689-697.
- 421.Petit M., Guidat C., Daniel J., Denis E., Montoriol E., Lim K-Y., Kovarik A., Leitch A.R., Grandbastien M-A., Mhiri C. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco // *New Phytol.* 2010. 186: 135–147.
- 422.Petrov D.A., Aminetzach Y.T., Davis J.C., Bensasson D., Hirsh A.E. Size matters: non-LTR retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila* // *Mol. Biol. Evol.* 2003. 20: 880–892.
- 423.Petrov D. A., Hartl D. L. High rate of DNA loss in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* species groups // *Mol. Biol. Evol.* 1998. 15: 293–302.
- 424.Pidal B., Yan L., Fu D., Zhang F., Tranquilli G., Dubcovsky J. The CArG-box in the promoter region of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary to mediate the vernalization response // *J. Hered.* 2009. 100: 355–364.
- 425.Pipiras E., Coquelle A., Bieth A., Debatisse M. Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome // *EMBO J.* 1998. 17: 325–333.
- 426.Pires J.C., Lim K-Y., Kovarik A., Matyasek R., Boyd A., et al. Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids

- reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors // *Am. J. Bot.* 2004. 91:1022–1035.
427. Plaschke J., Ganai M.W. and Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1995. 91: 1001-1007.
428. Pont C., Murat F., Confolent C., Balzergue S., Salse J. RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Genome Biol.* 2011. 12: R119.
429. Pontes O., Neves N., Silva M., Lewis M.S., Madlung A., Comai L., Viegas W., and Pikaard C.S. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. 101: 18240–18245.
430. Pontes O., Lawrence R.J., Silva M., Preuss S., Costa-Nunes P., Earley K., Neves N., Viegas W., Pikaard C.S. Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar dominance // *PLoS One.* 2007. 2: e1157.
431. Poulter R., Goodwin T. *DIRS 1* and the other tyrosine recombinase retrotransposons // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. 110: 575–588.
432. Preuss S., Pikaard C.S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: Insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1769: 383–392.
433. Preuss S.B., Costa-Nunes P., Tucker S., Pontes O., Lawrence R.J., et al. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins // *Mol. Cell.* 2008. 32: 673–684.
434. Pringle G.J., Murray B.G. Polyploidy and aneuploidy in the tamarillo *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). I. Spontaneous polyploidy and features of the euploids // *Plant Breed.* 1992. 108: 132-138.
435. Probst A.V., Dunleavy E., Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. 10: 192–206.

- 436.Puchta H. DSB-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells // *Genetics*. 1999. 152: 1173–1181.
- 437.Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution // *Journal of Experimental Botany*. 2005. 56: 1–14.
- 438.Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-wheat habit of growth in wheat // *Aust. J. Agric. Res.* 1971. 22: 23–31.
- 439.Pumphrey M., Bai J., Laudencia-Chingcuanco D., Anderson O., Gill B. S. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat // *Genetics*. 2009. 181: 1147–1157.
- 440.Qi B., Huang W., Zhu B., Zhong X., Guo J., Zhao N., Xu C., Zhang H., Pang J., Han F. et al. Global transgenerational gene expression dynamics in two newly synthesized allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*) lines // *BMC Biology*. 2012. 10: 3.
- 441.Raghavan V. and Srivastava P. S. Embryo culture. In: *Experimental embryology of vascular plants*. B. M. Johri, ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1982. pp. 195–230.
- 442.Rahman M.H. and O.P. Rajora. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*) // *Plant Cell Rep.* 2001. 20: 531-536.
- 443.Rajagopalan R., Vaucheret H., Trejo J., and Bartel D.P. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana* // *Genes Dev.* 2006. 20: 3407–3425.
- 444.Ramanna M.S., Jacobsen E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement—a review // *Euphytica*. 2003. 133: 3-18.
- 445.Ramsey J., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998. 29: 467–501.
- 446.Rapp R.A., Udall J., Wendel J.F. Genomic expression dominance in allopolyploids // *BMC Biol.* 2009. 7: 18.

- 447.Raskina O., Belyayev A., Nevo E. Repetitive DNAs of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their relation to S-genome species: molecular cytogenetic analysis // *Genome*. 2002. 45: 391–401.
- 448.Rastogi S., Liberles D.A. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization // *BMC Evol. Biol.* 2005. 5: 28.
- 449.Ray M., Tokach M.K. Cytology of $2n$ pollen formation in diploid crested wheatgrass, *Agropyron cristatum* // *Crop Sci.* 1992. 32: 1361-1365.
- 450.Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarosa* // *Plant molecular biology*. 1986. 4: 102–109.
- 451.Reeder R.H. Enhancers and ribosomal gene spacers // *Cell*. 1984. 38: 349-351.
- 452.Reeder R. H. 1985. Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants // *J. Cell Biol.* 1985. 101:112013–2016.
- 453.Reik W., Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome // *Nature Revue Genetics*. 2001. 2: 21–32.
- 454.Richards E.J. and F.M. Ausubel. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana* // *Cell*. 1988. 53: 127-136.
- 455.Rieseberg L.H., Blackman B.K. Speciation genes in plants // *Annals of Botany*. 2010. 106: 439–455.
- 456.Rieseberg L. H., C. V. Fossen, and A. M. Desrochers Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers // *Nature*. 1995. 375: 313–316.
- 457.Ringrose L. Polycomb comes of age: Genome-wide profiling of target sites // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. 19: 290–297.
- 458.Roeder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H. Leroy P. and Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // *Genetics*. 1998. 149: 2007-2023.
- 459.Rodriguez S., Perera E., Maestra B., Diez M., Naranjo T. Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum* // *Genome*. 2000. 43: 923–930.
- 460.Rubbi C.P., Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses // *EMBO J.* 2003. 22: 6068–6077.

461. Rubin E., Lithwick G., Levy A.A. Structure and evolution of the hAT transposon superfamily // *Genetics*. 2001. 158: 949–957.
462. Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. 60: 485–510.
463. Rychlik W. and Rhoads R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* 1989. 17: 8543–8551.
464. Sabot F., Schulman A.H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. // *Heredity*. 2006. 97: 381–388.
465. Salina E.A., Adonina I.G., Vatolina T.Yu., Kurata N.A Comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species // *Genetica*. 2004. 122: 227–237.
466. Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat poliploids // *Genome*. 2006. 49: 1023–1035.
467. Salina E.A., Pestsova E.G., Adonina I.G., Vershinin A.V. Identification of a new family of tandem repeats in Triticeae genomes // *Euphytica*. 1998. 100: 231–237.
468. Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G., Shcherban A.B., Afonnikov D.A., Belcram H., Huneau C., Chalhoub B. Isolation and sequence analysis of the wheat B genome subtelomeric DNA // *BMC Genomics*. 2009. 10: 414–428.
469. Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G., Shcherban A.B., Belcram H., Huneau C. and Chalhoub B. The impact of *Ty3-gypsy* group LTR retrotransposons *Fatima* on B-genome specificity of polyploid wheats // *BMC Plant Biol.* 2011. 11: 99.
470. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York. 1989.
471. SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhoniv A., Nakajima Y., Bennetzen J.L. The paleontology of intergene retrotransposons in maize // *Nature Genet.* 1998. 20: 43–45.
472. SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K. et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // *Science*. 1996. 274: 765–768.

- 473.Santra D.K., Santra M., Allen R.E., Campbell K.G., Kidwell K.K. 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. 128: 576–584.
- 474.Scarth R., Law C.N. The location of the photoperiodic gene, *Ppd2*, and an additional factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat // *Heredity.* 1983. 51: 607–619.
- 475.Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // *Chromosoma.* 2000. 109: 365–371.
- 476.Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // *Trends in Plant Science.* 1998. 3: 195-199.
- 477.Schmitz R.J., Amasino R.M. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1769: 269–275.
- 478.Schmitz-Linneweber C., and Small I. Pentatricopeptide repeat proteins: A socket set for organelle gene expression // *Trends Plant Sci.* 2008. 13: 663–670.
- 479.Schnable P.S., and Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration // *Trends in Plant Science.* 1998. 3(5): 175-180.
- 480.Schnable J.C., Springer N.M. and Freeling M. Differentiation of the maize subgenomes by genome dominance and both ancient and ongoing gene loss // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. 108: 4069–4074.
- 481.Schneider A., Linc G., Molnár-Láng M., Graner A. Fluorescence in situ hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat // *Plant Breed.* 2003. 122: 396–400.
- 482.Schranz M. E., S. Mohammadin, and P. P. Edger Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: The WGD radiation lag-time model // *Cur.Opin.Plant Biol.* 2012. 15: 147–153.
- 483.Schwartz Y.B., Pirrotta V. Polycomb complexes and epigenetic states // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008. 20(3): 266–73.

- 484.Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers // *Genome*. 1991. 34: 317-33.
- 485.Scoles C.J., Gill B.S.Z., Xin Y., Clarke B.C., McIntyre C.L., Chapman C. et al. Frequent duplication and deletion events in the 5S RNA genes and the associated spacer regions of the Triticeae // *Plant Syst. Evol.* 1988. 160: 105–122.
- 486.Sergeeva E.M., Salina E.A., Adonina I.G. et al. Evolutionary analysis of the *CACTA* DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. 284: 11.
- 487.Shaked H., Kashkush K., Ozkan H., Feldman M., Levy A. A. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // *Plant Cell*. 2001. 13: 1749–1759.
- 488.Sharma S., Raina S.N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. 109: 15-26.
- 489.Shay J.W. and Wright W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000. 1(1): 72-78.
- 490.Shcherban A.B., Borner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars // *Plant Breeding*. 2015a. 34: 49-55.
- 491.Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time // *Mol.Breed*. 2011. 29(3): 675–685.
- 492.Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions // *Cereal Res. Commun.* 2012. 40(3): 425-435.
- 493.Shcherban A.B., Khlestkina E.K., Efremova T.T., Salina E.A. The effect of two differentially expressed wheat *VRN-B1* alleles on the heading time is associated with structural variation in the first intron // *Genetica*. 2013. 141: 133-141.

494. Shcherban A.B., Strygina K.V., Salina E.A. *VRN-1* gene-associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species // *BMC Plant Biology*. 2015b. 15: 94
495. Shcherban A.B., Schichkina A.A., Salina E.A. 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*. 2016b. (Suppl 3):236
496. Shcherban A.B., Vaughan D.A., Tomooka N. Isolation of a new retrotransposon-like DNA sequence and its use in analysis of diversity within the *Oryza officinalis* complex // *Genetica*. 2000. 108: 145-154.
497. Shcherban A.B., Vaughan D.A., Tomooka N., Kaga A. Diversity in the integrase coding domain of a *gypsy*-like retrotransposon among wild relatives of rice in the *Oryza officinalis* complex // *Genetica*. 2001. 110: 43-53.
498. Shiba H., Kakizaki T., Iwano M., Tarutani Y., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation // *Nat. Genet*. 2006. 38: 297–299.
499. Shindo C., Aranzana M.J., Lister C., Baxter C., Nicholls C., Nordborg M., Dean C. Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2005. 138:1163–1173.
500. Shitzukawa N., Ikari C., Shimada S., Kitagawa S., Sakamoto K., Saito H., Ryuto H., Fukunishi N., Abe T., Takumi S., et al. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene // *Genes Genet. Syst*. 2007. 82: 167–170.
501. Shitsukawa N., Tahira C., Kassai K., Hirabayashi C., Shimizu T., Takumi S., Mochida K., Kawaura K., Ogihara Y., Murai K. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat // *Plant Cell*. 2007. 19:1723-1737.
502. Silva M., Queiroz A., Neves N. et al. Reprograming of rye rDNA triticales during microsporogenesis // *Chrom. Res*. 1995. 3: 492-496.
503. Skalicka K., Lim Y., Matyasek R., Matzke M., Leitch A., Kovarik A. Preferential elimination of repeated DNA sequences from the paternal, *N*.

- tomentosiformis* genome donor of a synthetic, allotetraploid tobacco // *New Phytol.* 2005. 166: 291-303.
- 504.Slotkin R.K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome // *Nat. Rev. Genet.* 2005. 8: 272–285.
- 505.Snape J.W., Flavell R.B., O'Dell M., Hughes W.G., Payne P.I. Intrachromosomal mapping of the nucleolar organizer region relative to three marker loci on chromosome 1B of wheat (*Triticum aestivum*) // *Theor. Appl. Genet.* 1985. 69: 263-270.
- 506.Soltis D. E. and P. S. Soltis Molecular data facilitate a reevaluation of traditional tenets of polyploid evolution // *Critical Reviews in Plant Sciences.* 1993. 12: 243–273.
- 507.Soltis D. E. and P. S. Soltis Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution // *Trends in Ecology & Evolution.* 1999. 14 : 348 – 352.
- 508.Soltis D.E., Soltis P.S., Tate J.A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation // *New Phytol.* 2003. 161: 173–191.
- 509.Somers D.J., Isaac P., Edwards K. et al. A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genetics.* 2004. 109: 1105-1114.
- 510.Song R., Llaca V., Messing J. Mosaic organization of orthologous sequences in grass genomes // *Genome Res.* 2002. 13: 1549–1555.
- 511.Song K., Lu P., Tang K., Osborn T.C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. 92: 7719–7723.
- 512.Spector D.L. The dynamics of chromosome organization and gene regulation // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. 72: 573–608.
- 513.Stebbins G. L. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London, UK. 1971.
- 514.Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // *Euphytica.* 1993. 65: 53-60.

515. Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // *Euphytica*. 1998. 100: 359–369.
516. Sung P., Klein H. Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. 7: 739–750.
517. Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H. *Gypsy*-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom // *Plant J.* 1998. 13: 699–705.
518. Surzycki S. J. *Basic Methods in Molecular Biology* (New York, NY: Springer-Verlag), 2000.
519. Swiezewski S., Liu F., Magusin A., Dean C. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target // *Nature*. 2009. 462 : 799—802.
520. Swift H. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1950. 36: 643-654.
521. Sýkorová E., Lim K.Y., Kunická Z., Chase M.W., et al. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales // *Proc. Biol. Sci.* 2003a. 270:1893-1904.
522. Sykorova E., Lim K-Y., Chase M.W., Knapp S., Leitch I.J. et al. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots // *Plant J.* 2003b. 34: 283–291.
523. Szűcs P., Karsai I., von Zitzewitz J., Mészáros K., Cooper L.L.D., et al. Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley // *Theor. Appl. Genet.* 2006. 112: 1277-1285.
524. Szűcs P., Skinner J.S., Karsai I., Cuesta-Marcos A., Haggard K.G., et al. 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. and Genomics.* 2007. 277: 249-261.
525. Takayama S., Isogai A. Self-incompatibility in plants // *Annual Review of Plant Biology.* 2005. 56: 467–489.

526. Tarutani Y., Shiba H., Iwano M., Kakizaki T., Suzuki G., Watanabe M., Isogai A. and Takayama S. Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility // *Nature*. 2010. 466: 983–987.
527. Tate J. A., Z. F. Ni, A. C. Scheen, J. Koh, C. A. Gilbert, Z. J. Chen, P. S. Soltis, and D. E. Soltis Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid // *Genetics*. 2006. 173: 1599–1611.
528. Tate J. A., V. V. Symonds, A. N. Doust, R. J. A. Buggs, E. Mavrodiev, L. C. Majure, P. S. Soltis, and D. E. Soltis Synthetic polyploids of *Tragopogon miscellus* and *T. mirus* (Asteraceae): 60 Years after Ownbey's discovery // *American Journal of Botany*. 2009. 96: 979–988.
529. Thompson J.D. et al. 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. 22: 4673–4680.
530. Throude M., Bolot S., Bosio M., Pont C., Sarda X., Quraishi U. M., et al. Structure and expression analysis of rice paleo duplications // *Nucleic Acids Res.* 2009. 37: 1248–1259.
531. Tochigi T., Udagawa H., Li F., Kitashiba H. and Nishio T. The self-compatibility mechanism in *Brassica napus* L. is applicable to F1 hybrid breeding // *Theor. Appl. Genet.* 2011. 123: 475-482.
532. Torres-Ruiz R. A., and V. Hemleben. Pattern and degree of methylation in ribosomal RNA genes of *Cucurbita pepo* L. // *Plant Mol. Biol.* 1994. 26: 1167–1179.
533. Trevaskis B., Hemming M. N., Peacock W. J., Dennis E. S. *HvVRN2* responds to day length, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status // *Plant Physiol.* 2006. 140: 1397–1405.
534. Trevaskis B., Hemming M. N., Dennis E. S., Peacock W. J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals // *Trends Plant Sci.* 2007. 12: 352–357.

535. Tsukahara S., Kobayashi A., Kawabe A., Mathieu O., Miura A., Kakutani T. Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis* // *Nature*. 2009. 461:423–426.
536. Turck F., Fornara F., Coupland G. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. 59: 573–594.
537. Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R.P., Laurie D.A. The pseudoresponse regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley // *Science*. 2005. 310: 1031–1034.
538. Udall J.A., Quijada P.A., Osborn T.C. Detection of chromosomal rearrangements derived from homoeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. // *Genetics*. 2005. 169: 967–979.
539. Uozu S., Ikehashi H., Ohmido N. et al. Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza* // *Plant Molecular Biology*. 1997. 35: 791–799.
540. Van Tuy J.M., De Vries J.N., Bino R.J. e.a. Identification of $2n$ -pollen producing interspecific hybrids of *Lilium* by flow cytometry // *Cytologia* 1989. 54: 737-745.
541. Vanyushin B.F. DNA methylation and epigenetics // *Russ.J. Genet.* 2006. 42: 985–97.
542. Vaughan D.A. The genus *Oryza* L: Current status of taxonomy. IRRI Research Paper Series, 1989. 138: 1-21.
543. Veronesi F., Mariani A., Tavoletti S. Screening for $2n$ gamete producers in diploid species of genus *Medicago* // *Genetic Agronomy* 1988. 42: 187-200.
544. Vershinin A.V., Schwarzacher T., and Heslop-Harrison J.S. The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes // *Plant Cell*. 1995. 7: 1823–1833.
545. Vicent C. M., Kalendar R., Ananthawat-Jonsson K., Schulman A. H. Structure, functionality, and evolution of the *BARE 1* retrotransposon of barley // *Genetica*. 1999. 107: 53–63.

546. Vicent C.M., Kalendar R., Schulman A.H. Envelopeclass retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants // *Genome Res.* 2001. 11: 2041–2049.
547. Vincentz M., and Flavell R. Mapping of ribosomal RNA transcripts in wheat // *The Plant Cell.* 1989. 1: 579-589.
548. Vision T.J., Brown D.G., Tanksley S.D. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis* // *Science.* 2000. 290: 2114–2117.
549. Vitte C., Bennetzen J.L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. 103: 17638–17643.
550. Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. // *Cytogenet Genome Res.* 2005. 110: 91–107.
551. von Zitzewitz J., Szűcs P., Dubcovsky J., Yan L., Francia E., Pecchioni N., Casa A., Chen T.H., Hayes P.M., Skinner J.S. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // *Plant Mol. Biol.* 2005. 59: 449–467.
552. Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A.K. et al. *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. 89: 7124–7128.
553. Wallace H. and Langridge W.H.R. Differential amphiplasty and the control of ribosomal RNA synthesis // *Heredity.* 1971. 27: 1–13.
554. Walsh B. Population-genetic models of the fate of duplicate genes // *Genetica.* 2003. 118: 279-294.
555. Wang X., Shi X., Hao B.L., Ge S., Luo J. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome and their implications for diploidization // *New Phytol.* 2005. 165: 937–946.
556. Wang J., Tian L., Lee H.S., Wei N.E., Jiang H., Watson B., et al. Genome wide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids // *Genetics.* 2006. 172: 507–517.

557. Ware D., and L. Stein Comparison of genes among cereals // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. 6: 121–127.
558. Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T. and Powell W. Genetic distribution of *BARE-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // *Mol.Gen.Genet.* 1997. 253: 687–694.
559. Wendel J. F. Genome evolution in polyploids // *Plant Molecular Biology.* 2000. 42: 225-249.
560. Wendel J. F., Schnabel A., Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) // *Proc.Natl. Acad.Sci. USA.* 1995. 92: 280-284.
561. Wendel J.F., Cronn R.C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton // *Advances in Agronomy.* 2003. 78: 139–186.
562. 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. 18: 2971–2984.
563. Wicker T., Guyot R., Yahiaoui N., Keller B. *CACTA* transposons in Triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements // *Plant Physiol.* 2003. 132: 52–63.
564. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // *Nat. Rev. Genet.* 2007. 8: 973–982.
565. Williams E.G., G. Maheswaran and J.F. Hutchinson Embryo and ovule culture in crop improvement // *Plant Breed.* 1987. 5: 181-236.
566. Winfield M.O., Lu C.G., Wilson I.D., Coghill J.A. and Edwards K.J. Cold- and light-induced changes in the transcriptome of wheat leading to phase transition from vegetative to reproductive growth // *BMC Plant Biol.* 2009. 9: 55.
567. Wolfe K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization // *Nat. Rev. Genet.* 2: 333–341.

568. Wolfgruber T.K., Sharma A., Schneider K.L., Albert P.S., Koo D-H., et al. Maize Centromere Structure and Evolution: Sequence Analysis of Centromeres 2 and 5 Reveals Dynamic Loci Shaped Primarily by Retrotransposons // *PLoS Genet.* 2009. 5: e1000743.
569. Worland A. J., Börner A., Korzun V., Li W. M., Petrović S., Sayers E. J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats // *Euphytica.* 1998. 100: 385–394.
570. Wu K.S., Tanksley S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice // *Mol. Gen. Genet.* 1993. 241: 225–235.
571. Würschum T., Boeven P.H., Langer S.M., Longin C., Leiser W. Multiply to conquer: Copy number variations at *Ppd-B1* and *Vrn-A1* facilitate global adaptation in wheat // *BMC Genetics.* 2015. 16: 96.
572. Xiong Y., Eickbush T.H. Origin and evolution of retroelements based on their reverse transcriptase sequences // *EMBO J.* 1990. 9: 3353–3362.
573. Xu X., A. P. Hsia, L. Zhang, B. J. Nikolau and P. S. Schnable Meiotic recombination break points resolve at high rates at the 5'- end of a maize coding sequence // *Plant Cell.* 1995. 7: 2151–2161.
574. Xu L., Chen H., Hu X., Zhang R., Zhang Z., Luo Z.W. Average gene length is highly conserved in prokaryotes and eukaryotes and diverges only between the two kingdoms // *Mol. Biol. Evol.* 2006. 23(6): 1107-8.
575. Yamauchi A., Hosokawa A., Nagata H., Shimoda M. Triploid bridge and role of parthenogenesis in the evolution of autopolyploidy // *American Naturalist.* 2004. 164: 101–112.
576. Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T. and Dubcovsky J. Positional cloning of wheat vernalization gene *VRN1* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100: 6263–6268.
577. Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J. and Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2004a. 109: 1677–1686.

578. Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V. and Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization // *Science*. 2004b. 303: 1640–1644.
579. Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. 103: 19581–19586.
580. Yang T.J., Yu Y., Chang S.B., de Jong H., Oh C.S., Ahn S.N., Fang E. and Wing R.A. Toward closing rice telomere gaps: mapping and sequence characterization of rice subtelomere regions // *Theor. Appl. Genet.* 2005. 111: 467–478.
581. Yang P.K., Kuroda M.I. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression // *Cell*. 2007. 128: 777–786.
582. Yousafzai F., Al-Kaff N., Moore G. Structural and functional relationship between the *Phl* locus protein 5B2 in wheat and *CDK2* in mammals // *Funct. Integr. Genomics*. 2010. 10: 157-166.
583. Yoshida T., Nishida H., Zhu J., Nitcher R., Distelfeld A., Akashi Y., Kato K. and Dubcovsky J. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2010. 120: 543–552.
584. Yu M., Carver B.F., 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. 215-216: 117-123.
585. Zakhrabekova S., Gough S.P., Braumann I., Müller A.H., Lundqvist J. et al. Induced mutations in circadian clock regulator *Mat-a* facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. 109(11): 4326-4331.
586. Zaratiegui M., Irvine D.V., Martienssen R.A. Non-coding RNA and gene silencing // *Cell*. 2007. 128: 763–776.
587. Zhang P., Friebe B., Gill B.S. Variation in the distribution of a genome-specific DNA sequences on chromosomes reveals evolutionary relations in the *Triticum* and *Aegilops* complex // *Plant Syst. Evol.* 2002. 235: 169–179.

- 588.Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y., Xia X.C., Dubcovsky J., He Z.H. 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. 48: 458–470.
- 589.Zhao X., Ganal M. W. Applications of repetitive DNA sequences in plant genome analysis. In Andrew H. Paterson , *Genome mapping in plants*, 111–125. Academic Press, San Diego, California, USA. 1996.
- 590.Zhao X., Wu T. and Wu R. Genome-specific repetitive sequences in the genus *Oryza* // *Theor. Appl. Genet.* 1989. 78: 201-209.
- 591.Zhao X. et al. Macromolecular organization and genetic mapping of a rapidly evolving chromosome-specific tandem repeat family (B77) in cotton (*Gossypium*) // *Plant Mol. Biol.* 1998. 38: 1031–1042.
- 592.Zhuang Y., Chen J-F. Changes of gene expression in early generations of the synthetic allotetraploid *Cucumis* × *hytivus* Chen et Kirkbride // *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2009. 56: 1071.
- 593.Zupunski V., Gubensek F., Kordis D. Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons // *Mol. Biol. Evol.* 2001. 18: 1849–1863.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Табл. 1 Виды комплекса *O. officinalis*, использованные в работе

Вид (синоним) ¹	Геном	Число хромосом	Кат. № ²	Происхождение
<i>O. officinalis</i> Wall ex Watt	СС	24	106520	Папуа Новая Гвинея
			*531-1	Малайзия
			7784	Мьянма
			105684	Индонезия
			*105396	Китай
			*100948	Индия
<i>O. eichingeri</i> Peter	СС	24	*105412	Шри Ланка
			101422	Уганда
			*105161	Уганда
<i>O. rhizomatis</i> Vaughan	СС	24	105659	Шри Ланка
			*105449	Шри Ланка
			105429	Шри Ланка
<i>O. australiensis</i> Domin	ЕЕ	24	105272	Австралия
			105268	Австралия
			101397	Австралия
<i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud.	ВВ	24	101434	Танзания
			*104073	Камерун
			104154	Камерун
<i>O. punctata</i> (= <i>O. schweinfurthiana</i> Prod.)	ВВСС	48	101330	Нигерия
			105137	Конго
			*105153	Нигерия
<i>O. minuta</i> J.S. Presl. ex C.B. Presl.	ВВСС	48	*82048	Филиппины
			101097	Филиппины
<i>O. officinalis</i> (= <i>O. malampuzhaensis</i> Krish. et Chand.)	ВВСС	48	*105223	Индия
			105328	Индия
<i>O. grandiglumis</i> (Doell) Prod.	ССDD	48	*101405	Бразилия
			105156	Бразилия
<i>O. latifolia</i> Desv.	ССDD	48	100165	Гватемала
			*105139	Гватемала
<i>O. alta</i> Swallen	ССDD	48	105138	Суринам
			*100161	Бразилия

¹Номенклатура комплекса (названия видов, геномы) соответствует Vaughan (1994)²Образцы получены из Международного генбанка риса (Лос-Банос, Филиппины) и Института агробиологических исследований (Цукуба, Япония).

*-образцы, взятые для выделения последовательностей INT-домена

Табл. 2 *PPD-D1/VRN-1* генотипы Европейских и Российских яровых сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*

№	Кат. №	Сорт	Страна происхождения	Генотип*				Срок колошения
				<i>PPD-D1</i>	<i>VRN-A1</i>	<i>VRN-B1</i>	<i>VRN-D1</i>	
1	TRI 811	Erbachshofer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	76
2	TRI 7254	Orca	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	77
3	TRI 771	Nordost Sommerweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	71
4	TRI 776	Weihenstephaner Zinn	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	75
5	TRI 17879	Naxos	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	63
6	TRI 6331	Hohenheimer Alte Zucht	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	76
7	TRI 824	Friedrichswerther Jabo	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
8	TRI 6332	Retzer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	75
9	TRI 842	Strubes Schlesischer Grannen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
10	TRI 852	Findlings Igel	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
11	TRI 853	Gelber Igel	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	75
12	TRI 917	Friedrichswerther Zelo Weizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	73
13	TRI 953	Bensings Früher	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	86
14	TRI 3258	Peragis Garant	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	76
15	TRI 4355	Perlweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	82
16	TRI 5307	Dippoldiswalder	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
17	TRI 7779	Lichtis Früh	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	64
18	TRI 3260	Rimpaus Langensteiner	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	75
19	TRI 8177	Adler	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	64
20	TRI 5322	Janetzkis Markgraf	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	72
21	TRI 8146	Probat	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	73
22	TRI 3256	Heines Koga	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	73
23	TRI 10174	Solo	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	72
24	TRI 3450	Weihenstephaner Früh	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i> <i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	72
25	TRI 799	Adlungs Alemannen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
26	TRI 841	Hildebrandts Grannen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
27	TRI 850	Friedrichswerther Grannen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
28	TRI 862	Znaiers Sommerbartweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
29	TRI 939	Jabo	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
30	TRI 1488	Hohenheimer Franken	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	82
31	TRI 1945	Oberpfälzer Landweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
32	TRI 2237	Lichti	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
33	TRI 3293	Bornebusch	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
34	TRI 3403	Breustedts Teutonen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
35	TRI 3438	Deutscher Roter	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
36	TRI 3444	Weißer Kolbenspelz	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
37	TRI 4937	Heines Koga II	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70

38	TRI 952	Heines 8080	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
39	TRI 3449	Endreß Fichtelgebirgs	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
40	TRI 3454	Roter Wechselweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	68
41	TRI 3455	Freisinger Landweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
42	TRI 4555	Rimpaus Bastardo, Temprano	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
43	TRI 4932	Breustedts Densi	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
44	TRI 4933	Breustedts Lera	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
45	TRI 4938	Carpo	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
46	TRI 5317	Gelchsheimer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
47	TRI 8408	Claudius	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
48	TRI 8456	Strubes Grano	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
49	TRI 8409	Kolibri	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
50	TRI 9471	Catriso	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
51	TRI 8457	Roter Löwe	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
52	TRI 817	Bensings Allerfrühster	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
53	TRI 9424	Janus	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	68
54	TRI 3401	Wieselburger Kolben	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
55	TRI 814	Heines Germania	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
56	TRI 818	Weihenstephaner Zimbern	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
57	TRI 802	Derenburger Weißähriger	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
58	TRI 772	Engelens 561	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
59	TRI 1565	Postelberger Früh	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
60	TRI 931	Stephanis Sieger	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
61	TRI 809	Eglfinger Hohenstaufen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
62	TRI 9423	Gaudenz	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	68
63	TRI 804	Kittnauer Sommerweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
64	TRI 796	Jassener	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
65	TRI 4931	Heines Fasan	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
66	TRI 789	Postelberger Wechsel St. 61	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	82
67	TRI 798	Bergers Giersdorfer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
68	TRI 805	Raekes Weisspelziger	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
69	TRI 820	Mahndorfer Viktoria	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
70	TRI 786	Zimmermanns Opferbaumer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
71	TRI 810	Wahrberger Sommerweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
72	TRI 29513	Melon	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
73	TRI 8147	Wachtel	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
74	TRI 29475	Kalistos	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
75	TRI 5306	Diamant	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
76	TRI 10975	Bali	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	67
77	TRI 7256	Perso	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	78
78	TRI 29484	Velos	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
79	TRI 29526	Anemos	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71

80	TRI 5443	Strubes Carpo	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	77
81	TRI 765	Stephansdorfer Land	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
82	TRI 8409	Kolibri	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
83	TRI 5430	Kesslers Früher Roter Schlanstedter	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
84	TRI 773	Nordstetter	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
85	TRI 5318	Gerda	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
86	TRI 5328	Mahndorfer Burgunder	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
87	TRI 9529	Kleiber	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
88	TRI 5444	Triesdorfer Opal	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
89	TRI 836	Zimmermanns Begrannter Opferbaumer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
90	TRI 822	Postelberger Wechsel St. 59	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	81
91	TRI 790	Postelberger Wechsel St. 7	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	80
92	TRI 766	Strubes Weißähriger Früher	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
93	TRI 783	Heines Noe	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	88
94	TRI 791	Wohltmanns Grüne Dame	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
95	TRI 803	Stadlers Weisspelziger	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
96	TRI 1329	Kaschitzer St. 202, Wechselweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	80
97	TRI 825	Schöndorfer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
98	TRI 823	Böhmischer Wechsel St.	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
99	TRI 828	Carons Eldinger Kleber	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
100	TRI 867	Kurzähriger Samtiger Bartweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
101	TRI 950	Hörnings Grüne Dame	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	78
102	TRI 5297	Bergers Ottersdorfer	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
103	TRI 5308	Eldinger Sonnenwend	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
104	TRI 5437	Heines Neuzucht	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
105	TRI 806	Wohltmanns Blaue Dame	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
106	TRI 3447	Bergers Hellgelber	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	78
107	TRI 11031	Goldene Aue	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
108	TRI 4749	Elscher Wechsel	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
109	TRI 4836	Kittnauer Wechselweizen	Германия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
110	TRI 9448	Vendel	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	66
111	TRI 16639	Troll (WW 26 303)	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	66
112	TRI 7220	Svalöfs Progress	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	75
113	TRI 9351	Weibulls Rang	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
114	TRI 5347	Svalöfs Ella	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	77
115	TRI 948	Svalöfs Kolben	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	75
116	TRI 4943	Weibulls Atle	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	71
117	TRI 8407	Svalöfs Alma	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
118	TRI 5426	Dalannes	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70

119	TRI 4946	Fylgia	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
120	TRI 7218	Svalöfs Drott	Швеция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
121	TRI 462	Saerinnen 66	Норвегия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	67
122	TRI 5323	Jaufulla	Финляндия	<i>PPD-D1a</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	65
123	TRI 9933	Veka	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
124	TRI 7223	Apu	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	70
125	TRI 466	Vehanti	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	64
126	TRI 2957	Tammi	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
127	TRI 2955	Kimmo	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	65
128	TRI 7224	Touko	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
129	TRI 470	Ruskea	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	67
130	TRI 3176	Sopu	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	68
131	TRI 5355	Vihantilainen	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
132	TRI 5320	Hauka	Финляндия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
133	TRI 5420	Jufy I	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	71
134	TRI 9339	Maris Halberd	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	70
135	TRI 3118	PLM	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	72
136	TRI 6960	April Bearded	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
137	TRI 9338	Maris Butler	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
138	TRI 781	Red Five	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
139	TRI 3164	William	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
140	TRI 5357	White Fife	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
141	TRI 9973	Maris Dove	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
142	TRI 797	Glyndon St. 1215	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
143	TRI 5296	Augustson	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
144	TRI 4945	Atson	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
145	TRI 9340	Maris Pinion	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
146	TRI 831	Pringles White Wheat	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
147	TRI 833	Haynes Bluestern	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	82
148	TRI 3459	Stripe	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
149	TRI 4365	Warren	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	61
150	TRI 9432	Compair	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	74
151	TRI 10286	Maris Ensign	Великобритания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	81
152	TRI 10173	Nudif TP 241	Бельгия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
153	TRI 10979	Cesar	Франция	<i>PPD-D1a</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	70
154	TRI 489	Pringles Champlain	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	70
155	TRI 6978	Florence Aurore	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	63
156	TRI 9526	Ardent	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
157	TRI 4924	Aubers	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
158	TRI 863	Suede de Mars	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
159	TRI 4353	Aurre de Printemps	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
160	TRI 980	Normandie	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69

161	TRI 6971	Bladette de la Garonne	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	89
162	TRI 834	Bordeaux	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
163	TRI 1948	Ble de Bordeaux	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
164	TRI 3088	Touzelle Blanche Barbu	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	72
165	TRI 4078	Vilmorin 29	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
166	TRI 2979	Richelle Blanch de Naples	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
167	TRI 4925	Champ Joli	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
168	TRI 5310	Eureka	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
169	TRI 3530	Bladette de Besplas	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	86
170	TRI 6973	Bon Moulin	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	93
171	TRI 6981	Gefir	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
172	TRI 6987	Innovation Bataille 30	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
173	TRI 7120	Suzanne Favereau	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	83
174	TRI 10994	VPM 1.1.3.4.	Франция	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	81
175	TRI 7559	Calatrava	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
176	TRI 5425	Chacra II	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
177	TRI 7558	Cabezorro	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	77
178	TRI 7561	Canaleja	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	48
179	TRI 6325	Rosate	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	68
180	TRI 7674	Morisco	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
181	TRI 5333	Pelajo	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
182	TRI 5466	Dwoling	Испания	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	74
183	TRI 7563	Navarro 122	Испания	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	103
184	TRI 8467	Impeto	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	78
185	TRI 7114	Forlani	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	83
186	TRI 777	Barletta	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	68
187	TRI 3128	Prodigio Italiano	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
188	TRI 3162	Apulia Strampelli	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
189	TRI 2937	Terminilo	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
190	TRI 3966	Maria Luiza	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
191	TRI 8471	Montagnano	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>VRN-D1a</i>	71
192	TRI 8469	Madif 113	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
193	TRI 4560	Abbandanzer	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	77
194	TRI 5394	Generoso	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	77
195	TRI 5395	Mara	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
196	TRI 8459	Cambino	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
197	TRI 3111	Francineto	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	83
198	TRI 3891	Gentile Rosso	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	87
199	TRI 3893	Florence 135	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	63
200	TRI 3456	Carlotta Marcoldi	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
201	TRI 5393	Funo	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	75
202	TRI 8188	Falchetto	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	69

203	TRI 5392	Fortunato	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	70
204	TRI 5338	Riccio	Италия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	72
205	TRI 8466	Gallini	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
206	TRI 7129	Tevere	Италия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	106
207	TRI 10104	BL H 7	Югославия	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	81
208	TRI 7904	B.L. 581	Югославия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
209	TRI 17636		Албания	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
210	TRI 7905	Academia RPR 48	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	64
211	TRI 5375	Akademia 48	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	70
212	TRI 5374	ICAR 1/42	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	69
213	TRI 8332	Cluj 1717	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	68
214	TRI 9795	Tirgu Frumos 48	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	70
215	TRI 10101	Cimpia Turzii 805	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	66
216	TRI 9796	Ulca Alba	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
217	TRI 9790	Magurele 7	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	64
218	TRI 8333	Cluj 2251	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	71
219	TRI 5423	Barrukan M.A.	Румыния	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
220	TRI 17648	griu de primovara (Frühlingsweizen)	Румыния	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
221	TRI 11751	Dimitrovka 5-2	Болгария	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	66
222	TRI 10283	Nr. 1926-10	Болгария	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	75
223	TRI 4917	Jubileina II	Болгария	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
224	TRI 9532	Okerman 804	Болгария	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	72
225	TRI 9533	Sadovska Ranozrejka	Болгария	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	72
226	TRI 10284	Sadovska Ranozrejka 2	Болгария	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>VRN-D1a</i>	74
227	TRI 9896	Sadowka	Болгария	<i>PPD-D1a</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	107
228	TRI 2149	Xylocastra	Греция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
229	TRI 849	Griechischer Andros	Греция	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
230	TRI 290	Böhmischer Wechselweizen	Чехия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76
231	TRI 5458	Selectas Tschechischer Rotwechselweizen	Чехия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
232	TRI 1712	Böhmischer Wechselweizen	Чехия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
233	TRI 4739	Dobrowitzer Wechsel	Чехия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
234	TRI 4681	Böhmischer Wechselweizen	Чехия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	Озимый тип
235	TRI 7940	Ribeiro	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	70
236	TRI 7939	Barbela	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	81
237	TRI 2985	Tremes Arroxoado	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	68
238	TRI 3100	Tremes Branco	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	71
239	TRI 3472	Transmontano	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	69
240	TRI 4002	Serrano	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1b</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	73
241	TRI 3848	Sacho	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>VRN-A1a</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	76

242	TRI 3534	Gentil Rosso	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	85
243	TRI 7504	Anafil Claro	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	84
244	TRI 3838	Bento	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	75
245	TRI 3142	Barbaro	Португалия	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	82

Российские сорта

1	?	Полтавка	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
2	К-38502 ²	Ферругинеум Н13	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
3	К-28310 ²	Саррубра	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
4	7751 ¹	Дружба	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
5	7171 ¹	Саратовская 46	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
6	7251 ¹	Лютесценс 53/12	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
7	6401 ¹	Саратовская 29	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
8	6931 ¹	Саратовская 210	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
9	К-30191 ²	Мильтурум 162	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
10	?	Славянка	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
11	К-41682 ²	Дуванка 501	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
12	7271 ¹	Альбидум 24	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
13	7991 ¹	Русак	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
14	8011 ¹	Лютесценс 55/11	Европейская часть России	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
15	7711 ¹	Жница	Урал	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
16	7651 ¹	Комета	Урал	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
17	7951 ¹	Иргина	Урал	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
18	6821 ¹	Стрела	Урал	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
19	7931 ¹	Ирен	Урал	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
20	7111 ¹	Бурятская 34	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>

21	----- ³	Красноярская 1103	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
22	----- ³	Тюменская 80	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
23	----- ³	Новосибирская 22	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
24	----- ³	Приленская 6	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
25	----- ³	Златозара	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
26	----- ³	Новосибирская 29	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
27	----- ³	Новосибирская 31	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
28	----- ³	Алтайская 70	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
29	7311 ¹	Иркутская 49	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
30	К-30137 ²	Балаганка	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
31	К-38366 ²	Тулун 14	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
32	К-38490 ²	Сибирка 1818	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
33	К-42153 ²	Нарымская 3	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
34	К-38783 ²	Искра	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
35	К-38506 ²	Победа	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
36	52725 ²	Иртышанка 10	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
37	К-36598 ²	Ударница	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
38	----- ³	Аленькая улучшенная	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
39	----- ³	Скороспелка улучшенная	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
40	----- ³	Омская 2078	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
41	----- ³	Лютесценс 937	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
42	----- ³	Скала	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
43	----- ³	Лена	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
44	----- ³	Бирюсинка	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
45	----- ³	Омская 12	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
46	----- ³	Приобская	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
47	----- ³	Лютесценс 521	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
48	----- ³	Алтайская 92	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
49	----- ³	Росинка	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
50	----- ³	Чернява 13	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
51	----- ³	Страда Сибири	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
52	----- ³	Новосибирская 15	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>

53	----- ³	Удача	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
54	----- ³	Омская 36	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
55	----- ³	Тулун 14h68	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
56	----- ³	Ангара 86	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
57	----- ³	Алтайская 98	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
58	----- ³	Омская 32	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
59	----- ³	Полюшко	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
60	----- ³	Катюша	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
61	----- ³	П.Вавенкова	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
62	----- ³	Тарская 8	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
63	----- ³	Тарская 10	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
64	----- ³	Боевчанка	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
65	----- ³	Лютесценс 25	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
66	14022 ¹	Цезиум 111	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
67	----- ³	Таежная	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
68	----- ³	Обская 14	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
69	----- ³	Омская 26	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
70	----- ³	П.Азиева	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
71	----- ³	Алтайская 99	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
72	----- ³	Тулун 15	Сибирь	<i>PPD-D1a</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
73	6801 ¹	Мильтурум 321	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
74	7331 ¹	Собаковская 3	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
75	7371 ¹	Сибирячка 4	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
76	7431 ¹	Сибирячка 8	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
77	7291 ¹	Омская 9	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
78	----- ³	Фора	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
79	----- ³	Сибирская 4	Сибирь	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
80	6851 ¹	Шортадинка	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
81	К-38515 ²	Акмолинка 1	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
82	7971 ¹	Лютесценс 56	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>

83	6841 ¹	Пиротрикс 28	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
84	К-34250 ²	Эритролеукон 503	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
85	К-35884 ²	Коктункульская 322	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-D1a</i>
86	6621 ¹	Кзыл Шарк	Казахстан	<i>PPD-D1b</i>	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
87	UA0101 500 ⁴	Коллективная 3	Украина	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
88	UA0107 289 ⁴	Аншлаг	Украина	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
89	UA0102 170 ⁴	Скороспелка 95	Украина	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
90	UA0106 506 ⁴	Струна Мироновская	Украина	<i>PPD-D1b</i>	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>

¹ Институт Цитологии и Генетики, Новосибирск, Россия

² Всероссийский институт растениеводства им. Вавилова, Санкт –Петербург, Россия

³ - Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции РАН, Краснообск, Россия

⁴ - Селекционно-генетический институт НАН Украины, Одесса, Украина

Табл. 3 *VRN-A1* полиморфизм у тетраплоидных видов *T. dicoccoides*, *T. araraticum* и *T. timopheevii* и их диплоидных предшественников

Род, секция, геном, вид	Номер по каталогу	Видовое название	Страна происхождения	VRN-A1 промотор	Инсерция 0.5 kb*	Делеция 1.4 kb*
section <i>Monococcum</i> Dum.AA <i>T. monococcum</i> L.	TRI 1510	<i>T. monococcum</i> L. var. nigricultum Flaksb.	Албания	<i>VRN-A1</i>	+/-	-
	TRI 1511	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Албания	<i>VRN-A1</i>	+	-
	TRI 17219	<i>T. monococcum</i> L. var. <i>monococcum</i>	Албания	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 19310	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Албания	<i>VRN-A1</i>	+	-
	TRI 1991	<i>T. monococcum</i> L. var. <i>vulgare</i> Körn.	Албания	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 2124	<i>T. monococcum</i> L. var. <i>atriaristatum</i> Flaksb.	Албания	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 28872	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Албания	<i>VRN-A1</i>	+	-
	TRI 3431	<i>T. monococcum</i> L. var. flavescens Körn.	Австрия	<i>VRN-A1f</i>	+	-
	TRI 19069	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Балканы	<i>VRN-A1</i>	+	-
	TRI 19372	<i>T. monococcum</i> L. var. <i>hornemannii</i> (Clemente) Körn.	Балканы	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 1996	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Болгария	<i>VRN-A1</i>	+	-
	TRI 1997	<i>T. monococcum</i> L. var. <i>vulgare</i> Körn.	Болгария	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 2125	<i>T. monococcum</i> L. var.	Болгария	<i>VRN-A1</i>	+	-

	vulgare Körn.				
TRI 2923	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	България	VRN-A1	-	-
TRI 1512	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 2001	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 2003	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 2004	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 2005	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 2012	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 3635	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 4322	<i>T. monococcum</i> L. var. flavescens Körn.	Европа	VRN-A1f	+	-
TRI 4323	<i>T. monococcum</i> L. var. pseudoflavescens Flaksb.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 565	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Европа	VRN-A1	+	-
TRI 577	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 580	<i>T. monococcum</i> L. var. flavescens Körn.	Европа	VRN-A1	-	-
TRI 12942	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Франция	VRN-A1	-	-
TRI 17973	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Германия	VRN-A1	-	-
TRI 19420	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Германия	VRN-A1	-	-
TRI 1982	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Греция	VRN-A1	+	-
TRI 1983	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Греция	VRN-A1	+	-
TRI 1989	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Греция	VRN-A1	-	-
TRI 644	<i>T. monococcum</i> L.	Греция	VRN-A1	+	-
TRI 17206	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Италия	VRN-A1	-	-
TRI 19182	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Марокко	VRN-A1	-	-
TRI 28870	<i>T. monococcum</i> L. var. monococcum	Марокко	VRN-A1	-	-
TRI 28871	<i>T. monococcum</i> L. var. sofianum Stranski	Марокко	VRN-A1f	+	-
TRI 13136	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Румыния	VRN-A1	-	-
TRI 13137	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Румыния	VRN-A1	-	-

	TRI 28868	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Румыния	VRN-A1	-	-
	TRI 17054	<i>T. monococcum</i> L. var. monococcum	Испания	VRN-A1f	+	-
	TRI 17212	<i>T. monococcum</i> L. var. monococcum	Испания	VRN-A1	+	-
	TRI 2017	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Швейцария	VRN-A1	-	-
	TRI 4327	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	Швейцария	VRN-A1	-	-
	TRI 17025	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 17026	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 17027	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 17730	<i>T. monococcum</i> L. var. monococcum	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 17947	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 19235	<i>T. monococcum</i> L. var. monococcum	Турция	VRN-A1	+/-	-
	TRI 2009	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 2010	<i>T. monococcum</i> L. var. vulgare Körn.	Турция	VRN-A1	-	-
	TRI 19070	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 19144	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 19411	<i>T. monococcum</i> L. var. flavescens Körn.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 19424	<i>T. monococcum</i> L. var. hohensteinii Flaksb.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 19434	<i>T. monococcum</i> L.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 28869	<i>T. monococcum</i> L. var. macedonicum Papag.	неизвестно	VRN-A1	+/-	-
	TRI 7130	<i>T. monococcum</i> L. var. hohensteinii Flaksb.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 895	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	неизвестно	VRN-A1	-	-
	TRI 19319	<i>T. monococcum</i> L. var. hornemannii (Clemente) Körn.	США	VRN-A1	+	-
<i>T. boeoticum</i> Boiss.	TRI 3015	<i>T. boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouidar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. rufinigrum (Tumanian) A.Filat. & Dorof.	Европа	VRN-A1	+	-
	TRI 17062	<i>T. boeoticum</i> Boiss.	Германия	VRN-A1	-	-
	TRI 17103	<i>T. boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Иран	VRN-A1h	-	-

TRI 17104	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Иран	VRN-AI	-	-
TRI 17105	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ExHauskn.) Grossh. var. viridinigrum Flaksb.	Иран	VRN-AIh	-	-
TRI 17106	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ex Hauskn.) Grossh. var. abovjanii A.Filat. & Dorof.	Иран	VRN-AIh	-	-
TRI 17094	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ExHauskn.) Grossh. var. viridinigrum Flaksb.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17098	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. Ex Hauskn.) Grossh. var. viridalbum A.Filat.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17101	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ex Hauskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Ирак	VRN-AI	-	-
TRI 17102	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. exHauskn.) Grossh. var. luteinigrum (Kovarsky) A.Filat. & Dorof.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17107	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17108	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17109	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Ирак	VRN-AI	-	-
TRI 17166	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ExHauskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17167	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 17168	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. ex Hauskn.) Grossh. var. abovjanii A.Filat. & Dorof.	Ирак	VRN-AI	-	-
TRI 17822	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. Ex Hauskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Ирак	VRN-AIh	-	-
TRI 18375	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaouдар (Reut. Ex Hauskn.) Grossh. var. gegadicum A.Filat.	Ирак	VRN-AIh	-	-

TRI 18377	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Ирак	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 18791	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. viridifuscum A.Filat.	Ирак	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 29442	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh.	Ирак	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 17117	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Ливан	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17164	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ExHausskn.) Grossh. var. viridinigrum Flaksb.	Ливан	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 17818	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. Ex Hausskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Ливан	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 17071	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. Ex Hausskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17072	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ExHausskn.) Grossh. var. biarpurunivir Gandilyan	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17073	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ExHausskn.) Grossh. var. viridinigrum Flaksb.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17074	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. viridifuscum A.Filat.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17076	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. abovjanii A.Filat. & Dorof.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17078	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. exHausskn.) Grossh. var. abovjanii A.Filat. & Dorof.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17079	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. viridifuscum A.Filat.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17080	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. abovjanii A.Filat. & Dorof.	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-
TRI 17081	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Турция	<i>VRN-A1h</i>	-	-
TRI 17090	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii	Турция	<i>VRN-A1</i>	-	-

	K.Hammer & A.Filat.				
TRI 17092	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 17111	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Турция	VRN-A1h	-	-
TRI 17125	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 17812	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 17814	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 17821	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. azerbaijanicum (Jakubz.) A.Filat. & Dorof.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18330	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18331	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1h	-	-
TRI 18338	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18339	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18341	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. Ex Hausskn.) Grossh. var. gegadiricum A.Filat.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18346	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. Thaoudar	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18351	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridihaussknechtii K.Hammer & A.Filat.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18359	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. harnicum A.Filat. & Dorof.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18434	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. thaoudar (Reut. ex Hausskn.) Grossh. var. azerbaijanicum (Jakubz.) A.Filat. & Dorof.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18437	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 18445	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	Турция	VRN-A1	-	-
TRI 17302	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	неизвестно	VRN-A1	-	-
TRI 18334	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	неизвестно	VRN-A1	-	-
TRI 18336	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	неизвестно	VRN-A1	-	-
TRI 18337	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	неизвестно	VRN-A1	-	-
TRI 18340	<i>T.boeoticum</i> Boiss. var. viridialbinigrescens K.Hammer & A.Filat.	неизвестно	VRN-A1	-	-

	TRI 18342	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	неизвестно	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 9862	<i>T.boeoticum</i> Boiss. subsp. <i>boeoticum</i> var. <i>pubescentinigrum</i> (Flaksb.) A.Filat. & Dorof.	быв.СССР	<i>VRN-A1</i>	-	-
	TRI 9863	<i>T.boeoticum</i> Boiss.	быв.СССР	<i>VRN-A1</i>	-	-
<i>Triticum L.</i> section <i>Urtutu</i> Dorof. et A.Filat AA <i>T. urartu</i> Thum ex Gandil.	TRI 17135	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17136	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17137	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17138	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>spontaneoalbum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17140	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17141	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>nigrum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17142	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17143	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17144	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17145	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17146	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>spontaneoalbum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1</i>	-	+
	TRI 17148	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>nigrum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17150	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>spontaneoalbum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17151	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>spontaneoalbum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17153	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>spontaneoalbum</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+
	TRI 17154	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. <i>albonigricans</i> Tumanian	Ливан	<i>VRN-A1u</i>	-	+

TRI 17155	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. spontaneoalbum Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17156	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. albonigricans Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17157	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. albonigricans Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17158	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17160	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17163	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17173	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. albonigricans Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17257	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. albonigricans Tumanian	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 18411	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. turcicum K.Hammer & A.Filat.	Ливан	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17118	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17119	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. pubescentiurartu K.Hammer & A.Filat.	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17121	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. pubescentiurartu K.Hammer & A.Filat.	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17122	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17123	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. nigrum Tumanian	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17124	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17126	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. nigrum Tumanian	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+
TRI 17128	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. spontaneoalbum	Турция	<i>VRN-AIu</i>	-	+

		Tumanian				
	TRI 17129	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. binartulutriru Gandilyan	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17132	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.binartulutriru Gandilyan	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17133	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17134	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var.spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17159	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. turcicum K.Hammer & A.Filat.	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17170	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. nigrum Tumanian	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
	TRI 17172	<i>T.urartu</i> Tumanian ex Gandilyan var. spontaneoalbum Tumanian	Турция	<i>VRN-Аlu</i>	-	+
section Dicoccoides Flaksb. BBAA T. turgidum ssp. dicoccoides Thell.	IG 113301	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иран	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 113302	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иран	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 131234	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иран	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 131232	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ирак	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 109085	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ирак	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 109088	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ирак	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	IG 131233	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ирак	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	127H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	165H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	280A	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	321H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	845H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	851H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	854H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	8935H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+
	8945H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	<i>VRN-Аlu'</i>	-	+

8960H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
9260H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
9285H	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
IG 46273	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1b	-	+
IG 46280	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
IG 46283	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
IG 46288	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1d	-	+
IG 46306	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1b	-	+
IG 46380	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
k-5198**	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN- A1u'	-	del. of 7.2 kb
PI 428100	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
PI 471031	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
PI 471068	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
TZ124A	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
TZ45A	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
TZ51A	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
TZ74A	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Израиль	VRN-A1u'	-	+
IG 139189**	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иордан	VRN- A1u'	-	del. of 7.2 kb
IG 46353	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иордан	VRN-A1u'	-	+
IG 46386	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иордан	VRN-A1u'	-	+
IG 46388***	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Иордан	VRN-A1u'	-	+
IG 110815	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 110818	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 110822***	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 110829	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 110832	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 139362	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 46297**	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN- A1u'	-	del. of 7.2 kb
IG 46524	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	VRN-A1u'	-	+
IG 46525	<i>T.turgidum</i> ssp.	Ливан	VRN-A1u'	-	+

	<i>dicoccoides</i> Thell.				
IG 46526	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46527	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46528***	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46531	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46532	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46534	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46538	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
PI 470978	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Ливан	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46287	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Палестина	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 117890	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 117894	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 119405	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 119408	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 119428	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 119430***	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 119437	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 139279	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 139956	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 139993	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 45492	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 45502	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 45506	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46277	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1d</i>	-	+
IG 46286	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46397	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46420	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46439	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46443	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46471	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+

IG 46480	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
IG 46522	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Сирия	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
PI 428017	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Турция	<i>VRN-A1u'</i>	-	+
PI 656867***	<i>T.turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> Thell.	Турция	<i>VRN-A1u'</i>	-	+

Яровые образцы выделены жирным шрифтом

* крупные перестройки внутри интрона 1 *VRN-A1* . +/- гетерозиготное состояние.

**Эти образцы содержат крупную делецию 7222 пн в 1-м интроне *VRN-A1* (*VRN-A1L*).

***Образцы, у которых промоторный район *VRN-B1* был секвенирован.

Табл. 3 (продолжение)

Каталожный №	Происхождение	Тип развития*	Источник**	<i>VRN-1</i> генотип***
<i>T. araraticum</i>				
PI 427400	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427398	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 538518	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427376	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427390	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427364	Ирак	-	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427392	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427416	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427380	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427403	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f-del VRN-G1</i>
PI 538512	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427385	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427386	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 538458	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 538461	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427407	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 427381	Ирак	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 538516	Ирак	F	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
PI 654340	Турция	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1a</i>
Cltr 17680	Иран	W	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
NSGC 861502	Неизвестно	-	USDA-ARS	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8802	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8739	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8602	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8913	Турция	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8878	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8822	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8938	Турция	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
KU-8926	Турция	W	Kyoto University	<i>VRN-A1f-del VRN-G1</i>
KU-1984B	Турция	W	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1a</i>
KU-8824A	Ирак	-	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>

KU-8944	Иран	W	Kyoto University	<i>VRN-A1f-del VRN-G1</i>
KU-1964	Турция	W	Kyoto University	<i>VRN-A1f VRN-G1a</i>
K-28244	Азербайджан	W	VIR	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
K-31627	Азербайджан	W	VIR	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
TA 976	Турция	-	WGGR, KSU	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
TA 1008	Турция	W	WGGR, KSU	<i>VRN-A1f VRN-G1a</i>
TA 972	Ирак	-	WGGR, KSU	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
IG 113296	Иран	S	ICARDA	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
IG 116165	Турция	F	ICARDA	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
IG 116168	Турция	F	ICARDA	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
IG 116170	Турция	F	ICARDA	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
TRI 11509	Иран	W	IPK	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
TRI 11507	Ирак	W	IPK	<i>VRN-A1f VRN-G1</i>
TRI 17417	Азербайджан	W	IPK	<i>VRN-A1f-del VRN-G1</i>
<i>T. timopheevii</i>				
K-29551	Грузия	S	VIR	<i>VRN-A1f-del/ins VRN-G1</i>
K-29558	Грузия	S	VIR	<i>VRN-A1f-del/ins VRN-G1</i>
PI 119442	Турция	S	USDA-ARS	<i>VRN-A1f-del/ins VRN-G1a</i>
ICG	Неизвестно, получен от Е.Б.Будашкиной	S	Институт цитологии и генетики СОРАН	<i>VRN-A1f-ins VRN-G1</i>
<i>Ae. speltoides</i>				
K-22	Армения	F	VIR	Все образцы содержат рецессивную форму <i>VRN-1</i> на основании ПЦР- анализа основных регуляторных районов гена.
K-2278	Иран	-	VIR	
K-453	Неизвестно	F	VIR	
K-77	Неизвестно	F	VIR	
K-911	Израиль	-	VIR	
K-1597	Турция	-	VIR	
I-551352	Сирия	-	VIR	
K-100	Турция	-	VIR	
K-1018	Неизвестно	-	VIR	
K-66	Неизвестно	F	VIR	
K-452	Неизвестно	F	VIR	
K-3257	Израиль	-	VIR	
K-1596	Иран	-	VIR	
I-570060	Турция	-	VIR	
K-2371	Неизвестно	-	VIR	
K-2303	Неизвестно	-	VIR	
K-2276	Турция	-	VIR	
K-443	Неизвестно	-	VIR	
K-1595	Иран	-	VIR	
K-48	Неизвестно	F	VIR	
K-1593	Иран	-	VIR	
K-1706	Македония	-	VIR	
K-1594	Иран	-	VIR	

*- Тип развития представлен либо в соответствии с описанием образца в каталоге, либо оценивалось в данной работе. W- озимый тип; S- яровой тип; F- факультативный, или промежуточный тип; “-“ - данные отсутствуют;

** USDA-ARS- Отдел аграрного хозяйства США, исследовательский сервис; WGGR, KSU- Коллекция материала пшеницы Канзасского Университета, США; VIR- Всесоюзный институт растениеводства им. Вавилова Н.И., Санкт-Петербург, Россия; IPK- Институт генетики и исследования культурных растений, Гатерслебен, Германия; ICARDA- Международный центр аграрных исследований в аридных зонах.

*** *VRN-1* генотипы были установлены на основании ПЦР- анализа, а для некоторых образцов (см. Табл. 11) было выполнено частичное секвенирование районов промотора и 1-го интрона для подтверждения результатов ПЦР.

Табл. 4 Структура RAPD- праймеров, использованных для анализа синтетического амфиплоида *Ae. longissima* TL05 x *T. urartu* TMU06

Номер праймера	Последовательность праймера (5'-3')
R032	TCTGAAACGTG
R036	ATGCCCTAGAG
R057	GATGGAACGAC
R068	CAACTAGACGG
R091	CATACGATACG
R092	TACCAAATCG
R158	TGGTCTCTCA
R160	TGGTCACTCA
R181	GCCAATCCTG
R182	GGACGGGTGC
R187	CGGGAGACCC
R194	AGGTCCTGA
R221	GCATGGAGCT

