

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

На правах рукописи

КСЕНИЯ ВЛАДИМИРОВНА СТРЫГИНА

**РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ У ВИДОВ ТРИБЫ
TRITICEAE**

Генетика – 03.02.07

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Елена Константиновна Хлесткина

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Регуляция экспрессии генов у эукариотических организмов	15
1.1.1. Регуляция экспрессии генов на уровне ДНК	16
1.1.1.1. Цис-регуляторные элементы	16
1.1.1.2. Метилирование ДНК	18
1.1.2. Факторы транскрипции	21
1.1.3. Репрессия транскрипции генов с участием микроРНК	22
1.1.4. Хроматин и его роль в регуляции экспрессии генов	23
1.2. Дуплицированные копии генов растений: эволюционная судьба и регуляция экспрессии	25
1.2.1. Судьба дуплицированных генов	26
1.2.2. Механизм появления копий генов	27
1.2.2.1. Сегментная дупликация	27
1.2.2.2. Полногеномная дупликация: полиплоидизация	29
1.2.3. Полиплоидия растительных организмов	30
1.2.3.1. Эволюция трибы Triticeae	31
1.3. Флавоноиды. Система генов биосинтеза флавоноидов у ячменя и пшеницы	33
1.3.1. Общая характеристика флавоноидных соединений	33
1.3.1.1. Биосинтез флавоноидных соединений	38

1.3.1.2. Генетическая регуляция биосинтеза флавоноидных пигментов	39
1.3.2. Флавоноидная пигментация у ячменя и пшеницы	42
1.3.2.1. Красно-коричневая окраска семенной оболочки	44
1.3.2.2. Голубая окраска алейронового слоя	45
1.3.2.3. Фиолетовая окраска перикарпа	46
1.3.2.4. Окраска вегетативных органов	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1. Идентификация и анализ генов <i>R2R3-Myb</i> , <i>bHLH Myc</i> и <i>WD40</i>	49
2.2. Растительный материал.....	50
2.3. Выделение антоцианов и измерение их относительного содержания	51
2.4. Выделение ДНК	51
2.5. Выделение ДНК для бисульфитного секвенирования. Обработка бисульфитом натрия.....	52
2.6. Выделение РНК, синтез комплементарной ДНК (кДНК)	52
2.7. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и дизайн праймеров.....	53
2.8. Количественная ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией)	53
2.9. Гидролиз продуктов ПЦР с помощью эндонуклеаз рестрикции ..	54
2.10. Электрофорез в агарозном геле	54
2.11. Выделение ДНК из агарозного геля и секвенирование.....	55
2.12. Бисульфитное секвенирование.....	55
2.13. Молекулярно-генетическое картирование генов	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	57

3.1. Идентификация и исследование структурной организации генов типа <i>R2R3-Myb</i>, <i>bHLH Mus</i> и <i>WD40</i>, потенциально регулирующих синтез флавоноидов в трибе Triticeae	57
3.1.1. Поиск и филогенетический анализ гомологичных последовательностей регуляторных генов биосинтеза флавоноидов типа <i>R2R3-Myb</i>, <i>bHLH Mus</i> и <i>WD40</i>	57
3.1.1.1. Соотношение <i>Ka / Ks</i> гомологичных последовательностей.....	63
3.1.2. Структурная организация идентифицированных генов	64
3.1.2.1. Анализ промоторных областей	66
3.2. Анализ транскрипционной активности регуляторных генов <i>R2R3-Myb</i>, <i>bHLH Mus</i>-типа и <i>WD40</i> ячменя и пшеницы	67
3.2.1. Экспрессия генов <i>R2R3-Myb</i>, <i>bHLH Mus</i>-типа и <i>WD40</i> ячменя..	67
3.2.2. Экспрессия генов <i>R2R3-Myb</i>, <i>bHLH Mus</i>-типа и <i>WD40</i> пшеницы	69
3.2.2.1. Анализ активности генов в coleoptile пшениц.....	69
3.2.2.2. Анализ экспрессии генов в перикарпе пшениц	73
3.2.2.3. Анализ экспрессии генов в динамике развития пшеницы.....	75
3.2.2.4. Анализ экспрессии генов в ответ на стресс	77
3.3. Молекулярное картирование генов <i>HvMus2</i> и <i>HvMrc1-H2</i> ячменя	80
3.4. Характеристика паттернов метилирования <i>cis</i>-регуляторных районов дуплицированных генов, вовлечённых в синтез флавоноидных соединений пшеницы	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	86
4.1. Эволюция генов MBW-комплекса трибы Triticeae.....	86
4.1.1. Гены <i>R2R3-Myb</i> и <i>bHLH-Mus</i>	86

4.1.2. Гены типа <i>WD40</i>	88
4.2. Компоненты MBW-комплекса пшеницы как генетические факторы регуляции экспрессии генов биосинтеза флавоноидов	88
4.2.1. R2R3-Myb	89
4.2.2. bHLH My	90
4.2.3. WD40	92
4.3. Тканеспецифическая экспрессия компонентов MBW-комплекса ячменя	92
4.4. Гены <i>Vlx</i> – факторы регуляции биосинтеза флавоноидов в алейроновом слое ячменя.....	93
4.5. Роль паттернов метилирования ДНК <i>цис</i> -регуляторных районов дуплицированных генов, вовлечённых в синтез фенольных соединений	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	100
ПРИЛОЖЕНИЯ	123

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ANS – Anthocyanin synthase (антоцианидинсинтаза)
- Ba – Blue aleurone
- BA — Intense blue aleurone
- bHLH – Basic helix-loop-helix
- Blx — Non-blue aleurone xenia
- BW — Bowman
- CHI – Chalcone isomerase (халконфлаваноноизомераза)
- CHS – Chalcone synthase (халконсинтаза)
- CDS – Coding sequence; кодирующая белок последовательность нуклеотидов, включающая старт- и стоп-кодоны
- CMT3 – Chromomethylase
- DFR – Dihydroflavonol reductase (дигидрофлавонол 4-редуктаза)
- DNMT, DMT, MET – DNA methyltransferase
- DRM – Domains rearranged methylase
- F3H – Flavanone-3-hydroxylase (флаванон 3-гидроксилаза)
- F3'H – Flavonoid 3'-hydroxylase (флавоноид 3'-гидроксилаза)
- F3'5'H – Flavonoid 3', 5'-hydroxylase (флавоноид 3', 5'-гидроксилаза)
- FLC – Flowering locus C
- FLS – Flavonol synthase (флавонолсинтаза)
- FNS – Flavone synthase (флавоносинтаза)
- HLH – Спираль-петля-спираль
- Inr – Initiator
- LAR – Leucoanthocyanidin reductase (лейкоантоцианидинредуктаза)
- LAX– Auxin resistant 1/like aux1
- MBW - Myb + bHLH + WD40
- mC - Метилирование ДНК; модификация цитозина на CpG, CpHpG и CpHpH участках генома
- Myb – Myeloblastosis (семейство ТФ растений)

Myс – Myelocytomatosis (семейство ТФ растений)

NIL – Near-isogenic lines

OWB – Oregon Wolfe Barleys

Pan – Purple anther

Pc – Purple culm

PIC – Preinitiation complex

Plb – Purple leaf blade

PLP — Purple lemma and pericarp

Pls – Purple leaf sheath

Pp – Purple pericarp

Pre – Red lemma and pericarp

R – Название повтора в белке Myb

R-1 – Red grain color

Ra – Red auricle

Rc – Red coleoptile

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

RISC – RNA-induced silencing complex

SSR - Simple sequence repeat (простые повторы, простые повторяющиеся последовательности)

SV40 – Simian virus 40

TSS – Transcription start site

WD40 – Семейство белков, содержащих структурные мотивы, состоящие примерно из 40 аминокислот, оканчивающихся дипептидом W-D (триптофан-аспарагиновая кислота)

x – Основное число хромосом

ТФ – Факторы транскрипции, транскрипционные факторы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Регуляция экспрессии генов является важной компонентой существования любого организма, благодаря которой происходит постоянный контроль различных биологических процессов, таких как рост, деление клеток, реакция на окружающую среду или стресс. У многоклеточных в основе регуляции экспрессии генов лежат генетические и эпигенетические механизмы. Генетическая регуляция экспрессии генов происходит с помощью сложного механизма, контролируемого факторами транскрипции (ТФ). Данные белки влияют на уровень экспрессии генов-мишеней путём связывания с их *цис*-регуляторными элементами. Эпигенетическая регуляция осуществляется посредством модификаций ДНК, РНК или гистоновых белков. В частности, такой эпигенетический фактор, как метилирование ДНК по остаткам цитозина (mC), имеет важное значение для связывания ТФ с регуляторной областью генов. Таким образом, контроль экспрессии генов требует сложных взаимодействий белков в районах регуляторных элементов гена, при этом характер этого взаимодействия определяется как самой последовательностью ДНК, так и характером её метилирования.

Флавоноиды представляют разнородную группу вторичных растительных метаболитов. Различные флавоноидные соединения играют важную роль при регуляции роста и развития растений и их защите от абиотических и биотических факторов стресса (Grotewold, 2006; Gould et al., 2008). Растительная пища, богатая определёнными флавоноидами, является источником соединений, полезных для здоровья человека и домашних животных. Показано, что флавоноиды обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами; их потребление часто связывают с уменьшением риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний (Ren et al., 2003; Nema et al., 2015).

Система генов биосинтеза флавоноидов является удобной моделью для изучения особенностей эволюции, организации и регуляции транскрипции генов, поскольку изменение на генном уровне можно учитывать на уровне фенотипа по изменению окраски. У таких важных зерновых культур, как ячмень (*Hordeum vulgare* L., геном HH, $2n = 2x = 14$) и пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L., геном VBAADD, $2n = 6x = 42$), последовательности многих ключевых генов пути биосинтеза флавоноидов определены (Himi et al., 2004, 2005, 2011; Khlestkina et al., 2008, 2009, 2013; Shoeva et al., 2014a, 2014b; Yang et al., 2004). Для некоторых из них идентифицированы паралогичные и гомеологичные копии (Khlestkina et al., 2008, 2013; Khlestkina, 2013, 2014; Shoeva et al., 2014b). Однако механизмы регуляции тканеспецифической экспрессии данных копий генов до сих пор слабо исследованы. Наименее изученными в этом плане остаются регуляторные гены, кодирующие транскрипционные факторы типа Мус (bHLH), Myb и WD40 (образующие регуляторный комплекс Myb + bHLH + WD40 (MBW) (Gonzalez et al., 2008; Feller et al., 2011; Xu et al., 2015)), с одной стороны, и эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов данного пути, с другой стороны.

Для решения данной задачи, а также для исследования генетических механизмов формирования флавоноидной окраски различных органов у представителей трибы Triticeae в данной работе были использованы генетические модели (почти изогенные линии), дающие возможность провести сравнительное исследование ортологичных, гомеологичных и паралогичных генов и установить роль генетических и эпигенетических механизмов в регуляции их тканеспецифичной экспрессии в ходе биосинтеза флавоноидов.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – установить роль дублицированных копий регуляторных и структурных генов биосинтеза флавоноидов в тканеспецифичной регуляции синтеза этих соединений у видов трибы Triticeae.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить с помощью поиска по гомологии полноразмерные последовательности гомеологичных и паралогичных копий регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae.
2. Провести сравнительный анализ структурно-функциональной организации дублированных регуляторных генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40*.
3. Выявить особенности эволюции гомеологичных и паралогичных копий генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae.
4. Определить характер экспрессии генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* в различных органах и тканях почти изогенных линий пшеницы *Triticum aestivum* и ячменя *Hordeum vulgare*.
5. Охарактеризовать паттерны метилирования ДНК промоторов различных дублированных копий генов биосинтеза флавоноидов пшеницы *T. aestivum*: регуляторного bHLH-кодирующего гена *TaMyc-A1* и структурных генов *TaF3H* и *TaCHI*.

Научная новизна работы. В ходе данной работы были получены новые данные об особенностях регуляции тканеспецифической экспрессии генов биосинтеза флавоноидов в трибе Triticeae. А именно, среди представителей семейств *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae были идентифицированы гены-кандидаты, предположительно вовлеченные в регуляцию синтеза флавоноидов, при этом представители семейства *WD40*, регулирующие биосинтез флавоноидов, в данной трибе были описаны впервые. Благодаря анализу полноразмерных последовательностей генов *R2R3-Myb*, *bHLH* типа *Myc* и *WD40*, были продемонстрированы их филогенетические взаимоотношения, а также оценены скорости эволюции представителей данных семейств генов. Впервые был найден *Myc*-кодирующий ген, предположительно являющийся фактором, определяющим

антоциановую окраску колеоптиле мягкой пшеницы – *TaMyc-B1*. Впервые было показано, что функциональный аллель *Myc*-кодирующего гена *HvMyc2* ячменя, является ключевым регулятором синтеза антоцианов в алейроновом слое ячменя. Была предложена роль гена *HvMpc1-H3* как *Myc*-кодирующего сорегулятора гена *HvMyc2*, запускающего тканеспецифический биосинтез антоцианов. Кроме того, анализ паттернов метилирования промоторов регуляторного *TaMyc-A1* и структурных *TaF3H* и *TaCH1* генов биосинтеза флавоноидов позволяет сделать вывод о том, что характер роли метилирования промоторов данных генов в оптимальных условиях выращивания не является критичным.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате настоящего исследования были получены новые знания о роли факторов транскрипции и паттерна метилирования ДНК промоторов регуляторных и структурных генов в регуляции экспрессии генов биосинтеза флавоноидов. Были разработаны CAPS-маркеры к ранее неаннотированным генам *HvMpc1-H2* и *HvMyc2* ячменя, с помощью которых удалось точно нанести данные последовательности на молекулярную карту. Данные маркеры могут быть эффективно использованы в практической селекции для маркер-контролируемого отбора генотипов ячменя при создании сортов с высоким содержанием антоцианов в зерне. Сведения об отличиях аллельных вариантов изученных регуляторных генов могут быть использованы для геномного редактирования ячменя, направленного на получение ячменя с повышенной диетической ценностью.

Положения, выносимые на защиту.

1. У представителей трибы Triticeae гены *WD40* эволюционируют медленнее, чем гены *R2R3-Myc* и *bHLH-Myc*.
2. Ген *HvMyc2* контролирует голубую окраску зерна ячменя.

3. Характер метилирования промоторов генов биосинтеза флавоноидов мягкой пшеницы не является ключевым в регуляции их транскрипции.

Вклад автора. Все основные научные результаты были получены автором самостоятельно: идентифицированы и охарактеризованы гены *Myb*, *bHLH* и *WD40* у видов трибы Triticeae; проведены эксперименты по анализу экспрессии выявленных генов в тканях сортов и линий ячменя и пшеницы, контрастных по проявлению антоциановой окраски; осуществлён анализ паттернов метилирования промоторов регуляторных и структурных генов биосинтеза флавоноидов у мягкой пшеницы.

Апробация результатов. Результаты данной работы были представлены на российских и международных научных конференциях:

1. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Семейство генов *MYC* злаковых растений: преобразования в ходе эволюции родов *Triticum* и *Aegilops* //Биология - наука 21го века: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 18-22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. – 2016. – С. 153.

2. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. *MYC* gene family in cereals: transformation in the course of the *Triticum* and *Aegilops* genera evolution //The Eighth International Young Scientists School “Systems Biology and Bioinformatics” – SBB-2016 (Novosibirsk, 22-25 August 2016). Abstracts. – 2016 – С. 73.

3. **Strygina K.V.**, Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Copies of the *TaMyc1* gene determining anthocyanin pigmentation of wheat grain: identification and analysis of the evolutionary features //The I International Workshop “Plant Genetics and Genomics For Food Security” (Novosibirsk, 26-28 August 2016). Abstracts. – 2016. – С. 58.

4. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. *MYC* gene family in cereals: transformation in the course of the *Triticum* and *Aegilops* genera evolution //The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2016 (Novosibirsk, 29 August – 2 September 2016). Abstracts. – 2016. – С. 298.

5. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Идентификация генов биосинтеза антоцианов в зерновке ячменя, и разработка диагностических маркеров для этих генов //III международная конференция «Генофонд и селекция растений», посвященная 130-летию Н.И. Вавилова (Новосибирск, 28-30 марта 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 66.

6. **Strygina K.V.**, Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Duplicated genes in polyploid plant species - case studies in wheat and potato //4-ая международная научная конференция "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" (PlantGen2017) (Казахстан, Алматы, 29 мая – 2 июня 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 116.

7. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. Identification and analysis of the *MYC* gene family in Triticeae //Systems Biology and Bioinformatics: the Ninth International Young Scientists School SBB-2017 (Yalta, Russia, 25-30 June 2017). Abstracts. – 2017. – С. 63.

8. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Идентификация и анализ генов семейства *MYC* Пшеницевых //Беляевские чтения: Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева (Новосибирск, 7–10 августа 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 211.

9. **Стрыгина К.В.** Регуляторные гены биосинтеза антоцианов в зерновке ячменя *Hordeum vulgare* L. //Конференция «Ломоносов 2018» (Москва, 9-13 апреля 2018 г.).

10. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Гены-регуляторы антоциановой окраски зерновки ячменя //IV международная конференция «Генофонд и

селекция растений» (Новосибирск, 4–6 апреля 2018 г.). Сборник тезисов. – 2018. – С. 338.

11. **Strygina K.V.**, Börner A., Khlestkina E.K. Transcriptional regulators of flavonoid biosynthesis: MYB, bHLH and WD40 gene families in Triticeae //17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference (Bucharest, Romania, 3-8 June 2018).

12. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. Regulatory genes of anthocyanins biosynthesis in the barley grain //The 11th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2018 (Novosibirsk, 20-25 August 2018). Abstracts. – 2018. – С. 188.

По материалам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. *MYC* gene family in cereals: Transformations during evolution of hexaploid bread wheat and its relatives //Molecular Biology. – 2017. – Т. 51. – №. 5. – С. 674-680.

2. **Strygina K.V.**, Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone //BMC plant biology. – 2017. – Т. 17. – №. 1. – С. 184.

3. Шоева О.Ю., **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Гены окраски ячменя //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – №. 3. – С. 333-342.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, перечня условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 157 страницах, содержит 29 рисунков и 17 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Регуляция экспрессии генов у эукариотических организмов

Запрограммированное осуществление биологических процессов осуществляется под контролем генетических систем, в которых с высокой точностью определена заданная пространственная и временная экспрессия генов. Регуляция экспрессии генов – важный аспект в жизни всех организмов, поэтому её адаптация в контексте эволюции является особенно значимой (Gu et al., 2004; Teichmann et al., 2004; Gu et al., 2005).

В эукариотических организмах по сравнению с прокариотическими развилась сложная система регуляции экспрессии генов, в которой контроль транскрипции подразделяется на три уровня взаимодействия (Gibcus et al., 2012; Mjelle, 2015). Первый уровень – уровень первичной структуры ДНК – формирует платформу взаимодействия, обеспечивая сайты связывания регуляторных последовательностей генов с факторами транскрипции. Второй уровень включает модификацию геномной ДНК и гистонов, микроРНК, факторы транскрипции и взаимодействие между ними. Именно этот уровень, создающий контекст регуляции транскрипции, в последние годы стал центром особого внимания. Третий уровень взаимодействий – трёхмерная упаковка хроматина, обеспечивающая транскрипционный контекст, который может либо облегчить, либо заблокировать начало транскрипции. Сворачивание ДНК в структуры более высокого порядка не является случайным событием и обеспечивает взаимодействия между промоторами генов и их дистальными регуляторными элементами (Henikoff et al., 2011; Gibcus et al., 2012). Считается, что эта сложность важна для генерации и поддержания различных типов клеток многоклеточных организмов (Mjelle, 2015).

1.1.1. Регуляция экспрессии генов на уровне ДНК

1.1.1.1. *Цис*-регуляторные элементы

Цис-регуляторные элементы представляют собой области некодирующей ДНК, которые контролируют транскрипцию близлежащего гена. *Цис*-регуляторные последовательности являются критическими компонентами генетических регуляторных сетей, контролирующих развитие организма (Cooper, 2000; Gibcus et al., 2012). Генетические мутации данных элементов часто приводят к потере геном своей функции (Brown, 2002).

Промотор гена. Промотором является область в начале гена, которая служит местом сборки преинициаторного комплекса транскрипции (preinitiation complex, PIC) и определяет положение сайта начала транскрипции (transcription start site, TSS) (Cooper, 2000). Транскрибирующиеся гены имеют два основных промоторных элемента: ТАТА-бокс и инициаторную последовательность (Initiator, Inr), которые служат в качестве специфических сайтов связывания для общих факторов транскрипции (Butler et al., 2002; Juven-Gershon et al., 2008). Другие *цис*-действующие последовательности служат сайтами узнавания для широкого спектра регуляторных факторов, которые контролируют экспрессию отдельных генов. Эти *цис*-регуляторные последовательности часто расположены перед ТАТА-боксом (Juven-Gershon et al., 2008). Например, две регуляторные последовательности, которые встречаются во многих эукариотических генах в пределах 100 пар нуклеотидов (п.н.) выше ТАТА-бокса, были идентифицированы путем исследования промотора гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (*Human alphaherpesvirus*); их консенсусные последовательности ССААТ и GGGCGG (ССААТ-бокс и GC-бокс, соответственно) (Cooper, 2000; Maston et al., 2006).

Энхансеры. Многие гены растительных и животных клеток контролируются удалёнными от сайта начала транскрипции регуляторными

последовательностями (Рисунок 1а). Эти последовательности, называемые энхансерами, были впервые идентифицированы при исследовании промотора вируса SV40 (*Simian virus 40; Macaca mulatta polyomavirus 1*) (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981). Активность подобных последовательностей не зависит ни от их расстояния, ни от их ориентации по отношению к TSS. Энхансеры, как и промоторы, функционируют путём связывания с факторами транскрипции, которые способны взаимодействовать с РНК-полимеразой или общими факторами транскрипции у промотора благодаря изменению конформации молекулы ДНК (Cooper, 2000; Maston et al., 2006; Li et al., 2016).

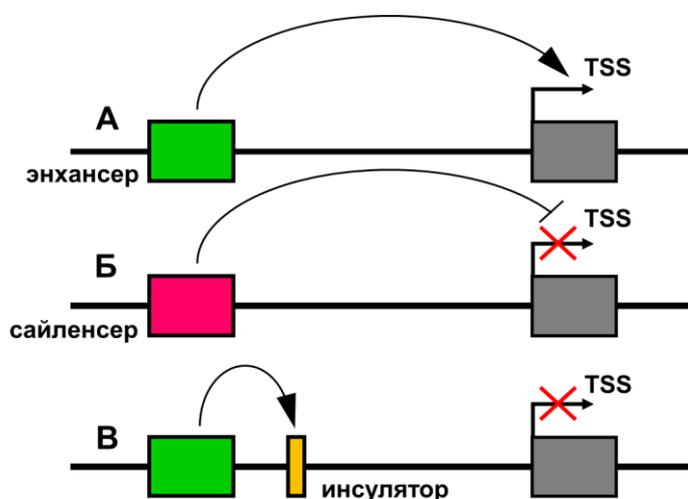


Рисунок 1. Цис-регуляторные элементы транскрипции (по Maston et al., 2006). (а, б) Энхансеры и сайленсеры функционируют как активаторы и репрессоры транскрипции, соответственно. (в) Инсуляторы функционируют как блокаторы гена от воздействия транскрипционных регуляторных элементов. Зеленый прямоугольник – энхансер, розовый прямоугольник – сайленсер, оранжевый прямоугольник – инсулятор, серый прямоугольник – область гена, TSS – transcription start site.

Сайленсеры. Специфичные последовательности, которые подавляют транскрипцию гена-мишени, называются сайленсерами (Рисунок 1б). Они, подобно энхансерам, как правило функционируют независимо от ориентации

и расстояния от промотора. Сайленсеры являются сайтами связывания репрессоров – факторов транскрипции, подавляющих экспрессию генов (Ogbourne, 1998; Cooper, 2000; Maston et al., 2006).

Инсуляторы. Последовательности ДНК, действующие как блокаторы воздействия транскрипционной активности соседних генов, называются инсуляторами (Рисунок 1в). Они разделяют геном на дискретные области экспрессии. Инсуляторы, в отличие от энхансеров и сайленсеров, функционируют в зависимости от положения, но независимо от ориентации. Инсуляторы могут блокировать связь промотор-энхансер и предотвращать распространение гетерохроматина (хроматина, отличающегося крайне низкой транскрибируемостью) (Cooper, 2000; West et al., 2002; Maston et al., 2006; Yang et al., 2011).

1.1.1.2. Метилирование ДНК

Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов регуляции экспрессии гена является метилирование ДНК (mC). Метилирование ДНК представляет собой ковалентную модификацию цитозина (5-метилцитозин) (Рисунок 2), которая преимущественно встречается на CpG-динуклеотиде у растений и животных. Однако для растений метилирование ДНК наблюдается не только по сайтам CpG, но и на участках CpHpG и CpHpH, где H представляет собой аденин, цитозин или тимин (Finnegan et al., 1998).

Метилирование цитозина действует как механизм контроля экспрессии генов и часто ассоциируется с долговременной транскрипционной репрессией (Bird, 1986). Тот факт, что mC может стабильно распространяться через клеточные деления, лежит в основе клеточной эпигенетической памяти, которая участвует в эмбриогенезе, клеточной дифференцировке и перепрограммировании. Примеры таких клеточных процессов включают инактивацию X-хромосомы, геномное импринтирование и сайленсинг повторяющихся элементов ДНК (Bird, 2002; Schübeler, 2015).

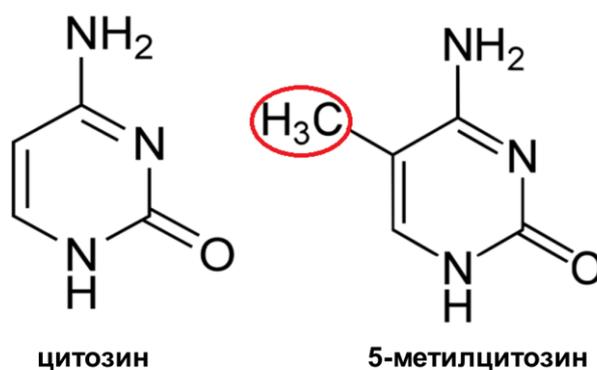


Рисунок 2. Цитозин и метилированный цитозин (5-метилцитозин).

Поддержание метилирования ДНК обеспечивается семейством ДНК метилтрансфераз DNMT1 (DNA methyltransferase 1), а метилирование *de novo* осуществляется семейством DNMT3. У растений метилирование *de novo* катализируется гомологичными факторами DNMT3 – DRM1 и DRM2 (domains rearranged methylase) в контексте CpHpH. Метилирование по сайту CpG поддерживается MET1 / DMT1 (DNA methyltransferase 1), а метилирование по CpHpG поддерживается специфичной для растений ДНК-метилтрансферазой CMT3 (chromomethylase 3) (Hauser et al., 2011; Grativol et al., 2012). Удаление mC метки в ДНК может происходить путём замещения метилированных цитозинов немодифицированными во время репликации ДНК и путём удаления метильной группы ДНК-гликозилазами (Tariq et al., 2004).

Метилирования участков генов, как было показано на *Arabidopsis thaliana*, чаще происходит в CpG-сайтах, в то время как не-CpG-метилирование (CpHpG и CpHpH) наблюдается намного реже. Однако если метилирование ДНК происходит вне области генов, то одинаково часто в сайтах CpG, CpHpH и CpHpG (Рисунок 3) (Zhang et al., 2006; Cokus et al. 2008). Такое не-CpG-метилирование связано гистоном H3K9 (см. ниже), который является эпигенетической маркой репрессивного хроматина (Johnson et al., 2007; Inagaki et al., 2010). Позже для риса *Oryza sativa* также было продемонстрировано, что CpG метилирование характерно для областей генов,

тогда как не-CpG-метилирование чаще встречается в мобильных элементах (Рисунок 3) (Zemach et al., 2010). Метилирование в 5'-области гена (включая промотор и часть транскрибируемой области) и 3'-области (включая часть транскрибируемой области и 3'-фланкирующие последовательности) может ингибировать экспрессию гена (Gehring et al., 2007; Zilberman et al., 2007). Предполагается, что метилирование в районе промотора гена ингибирует связывание регуляторного белка и подавляет транскрипцию (а также может ингибировать мобильные генетические элементы), тогда как метилирование внутри интронов и экзонов коррелирует с высоко экспрессирующимися генами (Zhang et al., 2006; To et al., 2015). В целом mC обеспечивает универсальный вклад в процесс роста и развития клеток эукариот путём регулирования активности генов.

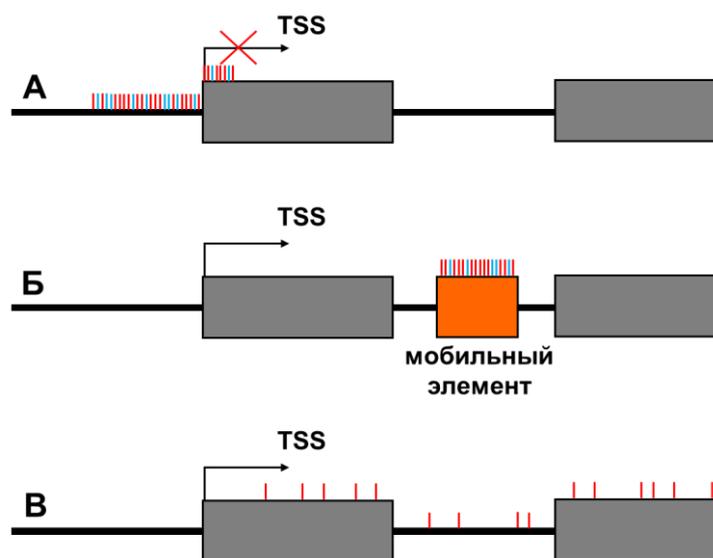


Рисунок 3. Схема метилирования ДНК (а) в TSS или в промоторах, (б) в интроне, (в) в области гена (по To et al., 2015). Красные штрихи – метилирование по сайтам CpG, синие штрихи – не-CpG-метилирование, красный крест – ингибирование транскрипции, серые прямоугольники – экзоны гена, оранжевый прямоугольник – мобильный элемент, TSS – transcription start site.

1.1.2. Факторы транскрипции

Как было сказано выше, изменения в регуляции транскрипции может происходить на разных уровнях: через изменения в сайтах связывания ДНК, расположенных внутри генов-мишеней (*цис*-мутации) или через *транс*-изменения, то есть через различия в количестве или активности факторов транскрипции (ТФ) – белков, связывающихся специфичным образом с регуляторными сайтами генов-мишеней для контроля уровня их экспрессии (Babu et al., 2004). Считалось, что изменения *цис*-регуляторных элементов лежат в основе большинства наблюдаемых изменений в регуляции транскрипции (Carroll, 2005; Wray, 2007; Prud'homme et al., 2007), а мутации генов, кодирующих ТФ, считались маловероятным источником изменчивости из-за возможных негативных плейотропных эффектов (Hsia et al., 2003; Carroll, 2005). Однако позже было показано, что мутации регуляторных белков могут играть важную роль в эволюции регуляторных сетей путём изменения экспрессии, молекулярных взаимодействий и посттрансляционных модификаций (Grove et al., 2009; Lynch et al., 2011; Reece-Hoyes et al., 2013; Sayou et al., 2014).

ТФ являются ценными компонентами генома, они играют важную роль практически во всех биологических процессах, в том числе у высших растений. Классификация ТФ обычно основана на характерных ДНК-связывающих доменах, которые распознают специфические последовательности ДНК в промоторах (Riechmann et al., 2002). Около половины всех ТФ растений, такие как WRKY, Dof и NAC, являются специфичными для растений и обладают ДНК-связывающими доменами, обнаруженными только у данных организмов (Riechmann et al., 2000). Остальная часть – это гены ТФ, которые не являются специфическими для растений, например, MADS, Myb, bHLH и bZIP. Эти гены играют важную роль при росте и развитии растения при изменяющихся условиях окружающей среды (Riechmann et al., 2002).

У растений ТФ характеризуются разнообразием семейств и большим количеством генов внутри каждого семейства по сравнению с животными. Количество генов ТФ у модельного организма *A. thaliana* составляет около 2000, что значительно больше, чем у видов *Drosophila melanogaster* или *Caenorhabditis elegans* (около 600), геномы которых имеют схожие с *A. thaliana* размеры (Riechmann et al., 2002). При этом и отношение числа генов, кодирующих ТФ, к общему числу белок-кодирующих генов у *A. thaliana* составляет около 6,0%, что значительно выше, чем у *D. melanogaster* (4,7%) и *C. elegans* (3,6%) (Riechmann, 2002; Rhee et al., 2003). В дополнение к большему количеству генов ТФ, у растений существует большее разнообразие семейств данных генов. Например, ТФ типа цинковые пальцы (zinc finger) составляют больше половины всех ТФ у *D. melanogaster* или *C. elegans*, тогда как у *A. thaliana* их общее число составляет около 20% (Riechmann et al., 2000). Эти характерные особенности ТФ растений свидетельствуют о том, что регуляция ряда процессов, в том числе транскрипции, может быть более сложной и отличаться большим разнообразием у растений, чем у животных.

1.1.3. Репрессия транскрипции генов с участием микроРНК

Некодирующие РНК (нкРНК) выполняют множество биологических функций, среди которых регулирование экспрессии генов путём подавления экспрессии мРНК на посттранскрипционном уровне. Такой процесс осуществляется за счёт активности малых некодирующих РНК длиной 18-24 п.н. называемых микроРНК (Cech et al., 2014). Данные молекулы были открыты в 1993 году при исследовании процесса развития *C. elegans* (Lee et al., 2003; Wightman et al., 2003). В настоящее время микроРНК обнаружены у вирусов, некоторых одноклеточных организмов, грибов, животных и растений.

Подобно транскрипционным факторам, микроРНК вносят важный вклад в контроль экспрессии генов при регуляции процессов развития и

дифференцировки, а также при болезнях (Gurtan et al., 2013). Гены микроРНК находятся в спейсерных участках генома или в интронах белок-кодирующих генов. МикроРНК транскрибируются как более длинные первичные микроРНК, которые расщепляются ферментом Drosha до шпилечных пре-микроРНК, а затем ферментом Dicer до зрелой микроРНК. После, благодаря образованию РНК-индуцированного сайленсинг комплекса (RNA-induced silencing complex, RISC) микроРНК с белками семейства Argonaute и другими полипептидами, происходит расщепление молекулы мРНК, комплементарной микроРНК, что приводит к последующей нейтрализации экспрессии гена-мишени (Szech et al., 2014).

1.1.4. Хроматин и его роль в регуляции экспрессии генов

Геномная ДНК во всех эукариотических клетках тесно связана с гистоновыми белками, образуя хроматин. Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома, которая состоит из 146 пар оснований ДНК, обернутых вокруг молекул гистонов H2A, H2B, H3 и H4, связанных с линкерной молекулой гистона H1. Далее хроматин конденсируется путем сворачивания в структуры более высокого порядка, организованные в большие петли ДНК. Эта упаковка эукариотической ДНК имеет важные последствия с точки зрения ее доступности в качестве матрицы для транскрипции, поэтому структура хроматина является критическим аспектом экспрессии генов в эукариотических клетках (Cooper, 2000).

Заметна связь между структурой хроматина и транскрипцией – активно транскрибирующиеся гены находятся в неконденсированном (открытом) хроматине. Однако даже в открытом хроматине такие гены остаются связанными с гистонами, поэтому факторы транскрипции и РНК-полимераза сталкиваются с проблемой взаимодействия не только с ДНК, но и с белками хроматина (Dame, 2005). Этот эффект облегчается модификациями гистоновых белков активно транскрибирующихся генов (Bowman et al., 2014).

Гистоны могут подвергаться таким посттрансляционным модификациям, как ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, рибозилирование и биотинилирование (Tariq et al., 2004; Liu et al., 2010). При этом было установлено, что аминокислоты N-концевых гистонов H3 и H4 легче модифицировать, чем другие гистоновые аминокислоты (Chen et al., 2010). Ацетилирование, фосфорилирование, моноубиквитинирование и триметилирование лизина в положении 4 гистона H3 (H3K4) усиливают транскрипцию, тогда как диметилирование лизина в положениях 9 и 27 гистона H3 (H3K9 и H3K27) её подавляют (Zhang et al., 2007; Chinnusamy et al., 2009; Veiseth et al., 2011; Grativol et al., 2012).

Все модификации гистонов являются обратимыми, что обеспечивает гибкий способ регулирования экспрессии генов, в частности, в реакции растений на изменения окружающей среды. Например, переход *A. thaliana* от вегетативной фазы развития к репродуктивной находится под контролем гена *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), Данный ген, кодирующий MADS-домен-содержащий фактор транскрипции, действует как репрессор цветения (Sheldon et al. 1999; Theissen et al., 2000; Schmitz et al., 2007). Регуляция экспрессии *FLC* и его репрессия включает в себя ряд процессов ремоделирования хроматина, связанных с метилированием лизина в положениях 9 и 27 гистона H3 (De Lucia et al., 2008; Bastow et al., 2004). Репрессирующий комплекс белков метилирует гистон H3 на протяжении промотора, первого экзона и первого интрона *FLC*, закрепляя репрессированное состояние этого гена (Bastow et al., 2004; De Lucia et al., 2008; Jarillo et al., 2009). При окончании цветения происходит деметилирование H3K9 и H3K27, триметилирование H3K4 и диметилирование H3K36 и возврат хроматина *FLC* к открытому состоянию. Регуляция экспрессии *FLC* стала моделью эпигенетической регуляции экспрессии генов у растений (Schmitz et al., 2007; Farrona et al., 2008).

1.2. Дублицированные копии генов растений: эволюционная судьба и регуляция экспрессии

Геномы эволюционируют за счёт точечных мутаций, хромосомных перестроек, появления генов *de novo* и дубликации генов и геномов. Дубликация гена, предшествующая возникновению гена с новой функцией, считается одной из основных направляющих сил эволюции. Дубликации являются основным материалом для появления новых генов, а «эволюция путем дубликации генов» стала общим принципом, очевидным из-за распространенности повторяющихся последовательностей во всех секвенированных геномах бактерий, архей и эукариот (Zhang, 2003). Так, около 50% генов прокариот и 90% эукариот являются результатом дубликаций (Lynch et al., 2000; Babu et al., 2003; Teichmann et al., 1998, 2004; Conant et al., 2008; Ohno, 2013).

Многочисленные последовательные изменения, в том числе дубликации генов, являются необходимой частью адаптации организма к окружающей среде. Например, копирование генов, кодирующих ТФ, с последующей структурной дивергенцией и функциональной диверсификацией полученных копий вносит важный вклад в развитие транскрипционных сетей (Gu et al., 2005; Wapinski et al., 2007, 2010; Thompson et al., 2013).

Дубликация может быть сегментной (удвоение участка хромосомы с образованием паралогичных копий и кластеров генов) или может охватывать весь геном (полногеномная дубликация, полиплоидизация) (Stephens, 1951; Ohno, 2013). Сегментная дубликация и полиплоидизация соответствуют разным эволюционным процессам с отличающимися последствиями. Сегментная дубликация является частым событием, в то время как полиплоидизация – это гораздо более редкое явление, которое ведет к исчезновению генов и повторной диплоидизации (следующая после дубликации геномная реорганизация и массовая потеря генов или их функций, Wolfe, 2001). Тем не менее, дублицирование целого генома считается важным

фактором эволюции и основным источником дупликации генов у растений (Wendel, 2000). Например, за последние 150 миллионов лет у *A. thaliana* произошло три случая полиплоидизации. В отличие от растений, у *Drosophila* в течение последних 600 миллионов лет событий полиплоидизации обнаружено не было (Levasseur et al., 2011).

1.2.1. Судьба дублицированных генов

После дупликации две идентичные копии гена, чаще всего, являются излишними, поэтому в дальнейшем отдельные гены претерпевают одно из возможных эволюционных событий: один из дублицированных генов становится нефункциональным (потеря функции путём делеции или псевдогенизации), один из дублицированных генов может приобрести новую функцию (неофункционализация) или же образовавшиеся копии могут разделить между собой функции гена до дупликации (субфункционализация) (Lynch et al., 2000a).

Однако многие гены сохраняются на протяжении эволюции, а избыточность, обеспечиваемая дублицированными генами, может облегчить адаптацию видов и генетическую устойчивость к изменениям условий окружающей среды (Muller, 1925; Gu et al., 2003). В таких случаях оба гена сохраняются, претерпевая адаптивные мутации. Быстрая дивергенция между копиями генов в ответ на биотические и абиотические факторы стресса может способствовать субфункционализации, неофункционализации и эволюции адаптивного механизма к изменениям окружающей среды (Lynch et al., 2000a, 2000b; Seoighe et al., 2004). Относительно медленная скорость изменения экспрессии дублицированных генов может обеспечивать селективное преимущество, зависящее от дозы гена, тем самым позволяя организмам точно настраивать сложные регуляторные сети (Chen, 2007). Например, если ген изначально экспрессировался в двух тканях, то после образования его копии каждая может начать работать тканеспецифично.

Для примера рассмотрим гены-транспортёры ауксина сои *GmLAX* (*AUXIN RESISTENT 1/LIKE AUX1*) (Chai et al., 2016). Известно, что ауксин играет важную роль в регуляции роста и развития растений, а также в реакции растений на абиотические стрессы. В основном это достигается за счёт его неравномерного распределения в растении. Ауксиновые транспортёры – главные участники полярного транспорта ауксина. Соя (*Glycine max*), будучи палеополиплоидом, имеет 20 пар хромосом, которые возникли благодаря, по меньшей мере, двум раундам полиплоидизации (Walling et al., 2006). В геноме сои в общей сложности было идентифицировано 15 генов *GmLAX*, в том числе семь дублированных пар генов, распределённых по 10 хромосомам (Chai et al., 2016). Несмотря на высокий процент идентичности, гены *GmLAX* демонстрируют тканеспецифичные паттерны экспрессии в семи тканях / органах, что указывает на их согласованное функционирование в процессе роста и развития растения. Кроме этого, анализ промоторов *GmLAX* выявил в их составе различные комбинации *cis*-регуляторных элементов, связанных со стрессом. Действительно, большинство *GmLAX* оказалось вовлечено в ответ на биотический и абиотический стресс. Таким образом, гены растений, связанные с реакцией на стресс, активируются в ответ на неблагоприятные условия, которые растения испытывают на протяжении всей их жизни. При этом для избегания конфликта копии генов экспрессируются специфично для разных тканей и органов.

1.2.2. Механизм появления копий генов

1.2.2.1. Сегментная дупликация

Сегментные дупликации являются результатом удвоения крупных сегментов геномной ДНК, которые варьируются от одной до нескольких сот тысяч пар нуклеотидов, и могут быть разделены на два класса – межхромосомные и внутрехромосомные дупликации. Межхромосомный

дупликации происходят в негомологичных хромосомах, в то время как внутрихромосомные дупликации обычно встречаются в одной хромосоме или в одном хромосомном бэнде (Emanuel et al., 2001).

Наиболее хорошо описанным механизмом, вызывающим сегментные дупликации длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов, является неравный кроссинговер (Bailey et al., 2002, 2006; Aleshin et al., 2010; Levasseur et al., 2011). Он может произойти, когда определенные сайты двух хроматид представляют собой обширные (более 100 п.н.) повторы. В таком случае сегментная дупликация может осуществиться путём гомологичной рекомбинации (Mehta et al., 2014).

Дупликации также могут формироваться с помощью механизмов, которые не связаны с хромосомными обменами, а скорее зависят от событий, происходящих внутри одной хромосомы. В основе некоторых механизмов лежат палиндромные последовательности ДНК, дающие тандемные инверсионные дупликации с соседними копиями в ориентации инверсии (Reams et al., 2015).

Другими механизмами, которые генерируют сегментные дупликации, являются транспозиции и ретротранспозиции (Levasseur et al., 2011), осуществляемыми специфическими классами геномной ДНК – мобильными элементами. Поскольку транспозиция представляет собой процесс «вырезания и вставки», то маловероятно, что транспозиция может привести к удвоению гена. Однако транспозиция может приводить к дупликации, если она возникает в зародышевых клетках до мейоза и перемещает ДНК из одной группы хромосом в другую. При этом ретротранспозиция, в отличие от транспозиции, является довольно частым явлением для многих эукариот. Для многоклеточных организмов максимальный размер возможного дублицированного сегмента при ретротранспозиции соответствует длине транскрипта (Levasseur et al., 2011).

1.2.2.2. Полногеномная дупликация: полиплоидизация

Такое событие, как полногеномная дупликация, описано как для бактерий, так и для эукариотических организмов. Чаще всего полиплоидизация встречается у растений (Hansen, 1978; Otto et al., 2000; Tobiasson et al., 2006). Полиплоиды разделяют на два класса на основе механизма их происхождения: автополиплоиды, возникшие в результате кратного увеличения числа хромосом одного вида, и аллополиплоиды, произошедшие в результате межвидовой гибридизации. При этом образовавшиеся копии генов-ортологов в результате объединения двух родственных геномов в один за счёт отдалённой гибридизации называют гомеологами.

Полиплоидизация может происходить под влиянием различных факторов, таких как воздействие высоких или низких температур, химических веществ, ионизирующего излучения и др. Механизм действия данных факторов сводится к нарушению расхождения хромосом в митозе (митотическая полиплоидия) или мейозе (мейотическая полиплоидия). В результате данных событий образуются полиплоидные соматические клетки или половые клетки с изменённым числом хромосом (нередуцированные гаметы), соответственно (Levasseur et al., 2011). Слияние двух нередуцированных гамет между собой даёт тетраплоидную зиготу. Но препятствием в образовании тетраплоидных форм является тот факт, что при скрещивании с диплоидными родственниками образуются триплоиды, которые обычно считаются эволюционным тупиком, поскольку они, как правило, производят анеуплоидные гаметы из-за проблем хромосомного спаривания и сегрегации во время мейоза (Henry et al., 2005). Однако было продемонстрировано, что триплоиды могут давать эуплоидные (гаплоидные, диплоидные, триплоидные) гаметы, которые затем могут продуцировать триплоидное или тетраплоидное потомство. Таким образом, триплоиды могут способствовать переходу от диплоидии к тетраплоидии.

Полиплоиды имеют множество преимуществ перед диплоидными предшественниками (Müntzing, 1936). Благодаря дублицированным генам организмами приобретаются новые функции, такие как устойчивость к болезням и адаптация к стрессу и экстремальным окружающим условиям (Müntzing, 1936, Panchy et al., 2016). Кроме того, для таких культурных растений, как пшеница *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, ВВААDD), хлопок *Gossypium hirsutum* ($2n = 4x = 52$, ААD₁D₁) и соя *Glycine max* ($2n = 40$, палеополиплоидный организм), аллополиплоидизация способствовала улучшению важных агрономических признаков, таких как качество зерна и время цветения (Panchy et al., 2016). Кроме того, для многих аллополиплоидов характерен гетерозис или увеличение жизнеспособности за счет объединения различных аллелей генов, поэтому многие культуры имеют полиплоидное происхождение (Nilu, 1993; Masterson et al., 1994).

1.2.3. Полиплоидия растительных организмов

Эволюция генов и геномов после полиплоидизации остаётся предметом обширных исследований в области эволюционной биологии (Sémon et al., 2007). Полиплоидия широко распространена в растительном мире. Она является основой в эволюции и видообразовании как диких, так и культурных растений. В отличие от геномов других эукариот, геномы растений, как правило, развиваются более быстрыми темпами, что приводит к более высокому генетическому разнообразию (Kejnovsky et al., 2009; Murat et al., 2012). Например, две главные клады покрытосеменных – однодольные и двудольные – дивергировали, согласно расчётам, около 140-150 миллионов лет назад (Chaw et al., 2004).

Полногеномные дубликации играют особенно важную роль в кладе покрытосеменных – все покрытосеменные являются палеополиплоидами (древними полиплоидами), которые появились благодаря, по меньшей мере, одному событию дубликации целого генома с последующей массовой потерей

генов и их функций и геномной реорганизацией посредством процесса, называемого диплоидизация (Wolfe, 2001; Doyle et al., 2008; Tang et al., 2008; Paterson et al., 2010). Известными примерами диплоидизированных палеополиплоидов являются арабидопсис *A. thaliana* (Vision et al., 2000; Bowers et al., 2003), рис *O. sativa* (Yu et al., 2005) и кукуруза *Zea mays* (Gaut, 2001). На этих, а также на примере других видов растений, чьи геномы полностью секвенированы, включая сорго *Sorghum bicolor* и *Brachypodium distachyon*, было показано, что они претерпели, по крайней мере, два акта полногеномных дупликаций. Причём это случилось более 70 миллионов лет назад, то есть до дивергенции современных Злаковых (Gramíneae) (Paterson et al., 2004, 2009; Tang et al., 2010; Jiang et al., 2013).

1.2.3.1. Эволюция трибы Triticeae

Многие роды и виды Triticeae являются аллополиплоидами, имеющими большее число хромосом, чем у типичных диплоидных представителей. Аллополиплоиды трибы Triticeae являются тетраплоидными или гексаплоидными организмами, имеющими геномную формулу XXYY или XXYYZZ, соответственно. (Li et al., 2016)

К трибе Triticeae относятся несколько важных зерновых культур, включая ячмень (*Hordeum*), рожь (*Secale*) и пшеницу (*Triticum*), последний общий предок которых существовал по разным оценкам 10-14 миллионов лет (Рисунок 4). Дивергенция ржи от общего предка *Triticum / Secale* произошла около 7 миллионов лет назад, в то время как диплоидные виды *Triticum* и *Aegilops* разошлись около 3 миллионов лет назад (Gornicki et al., 2014), и их геномы остаются очень схожими, за исключением нескольких хромосомных перестроек, таких как транслокация между хромосомами 4L и 5L, обнаруженными в диплоидных пшеницах *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) (King et al., 1994) и *Triticum monococcum* ($2n = 2x = 14$, A^mA^m) (Devos et al., 1995; Dubcovsky et al., 1996).

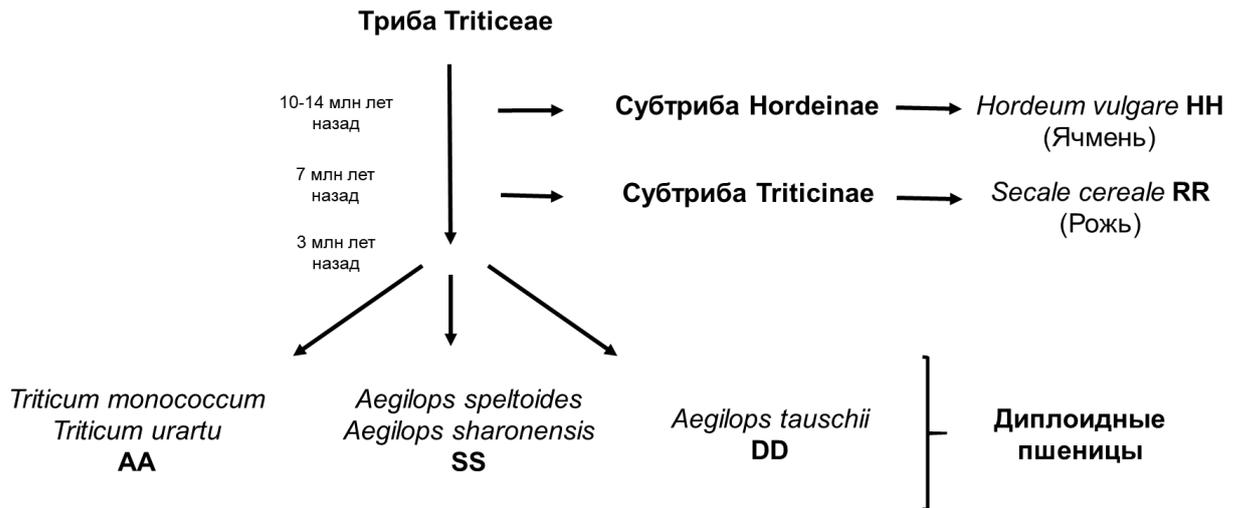


Рисунок 4. Эволюция трибы Triticeae (по Feldman et al., 2015). Стрелками обозначены основные события. Время оценивается в миллионах лет назад.

И *T. urartu*, и *T. monococcum* принимали участие в происхождении полиплоидных пшениц. За счёт гибридизации около 0,5 миллиона лет назад *T. urartu* с представителем секции Sitopsis, к которому из ныне существующих наиболее близок вид *Aegilops speltoides* ($2n = 14$, SS), возникли аллотетраплоидные виды *Triticum turgidum* / *Triticum dicoccoides* ($2n = 4x = 28$, ВВАА) и *Triticum timopheevii* ($2n = 4x = 28$, GGAA) (Gornicki et al. 2014) (Рисунок 5). В результате второго события гибридизации между *T. turgidum* и диплоидным видом *Aegilops tauschii* ($2n = 14$, DD) произошел ныне широко культивируемый аллогексаплоид пшеница мягкая *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, ВВАADD) (Gill et al., 1974; Dvorak et al., 1988; Marcussen et al., 2014) (Рисунок 5). Вторая гексаплоидная пшеница, *Triticum zhukovskyi* ($2n = 6x = 42$, GGAAA^mA^m) произошла благодаря гибридизации между *T. timopheevii* и диплоидной пшеницей *T. monococcum* (Рисунок 5).

Таким образом, полиплоидные пшеницы, в частности *T. aestivum*, содержат три отдельных, но связанных между собой диплоидных генома, что делает данный объект привлекательной моделью для исследования

функциональных особенностей и эволюционных преобразований дублированных копий генов.

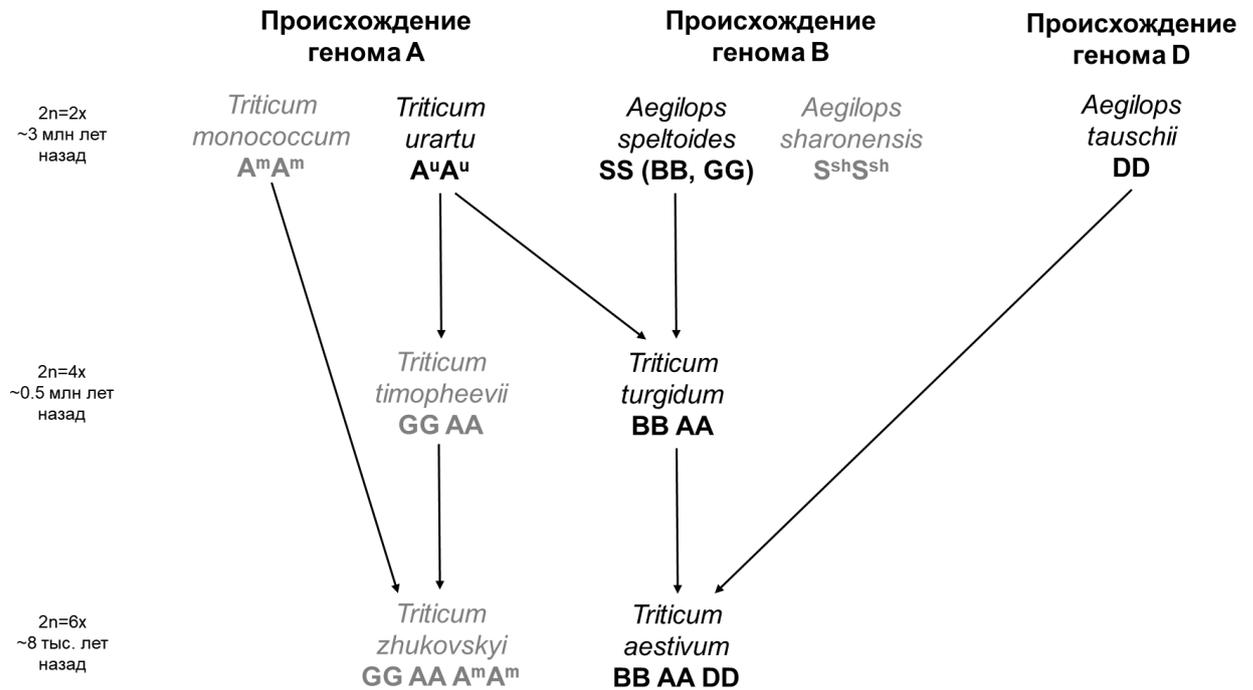


Рисунок 5. Схема происхождения полиплоидных видов пшеницы (по Feldman et al., 2015). Чёрным цветом выделен путь возникновения пшеницы мягкой *T. aestivum*. Время оценивается в миллионах лет назад.

1.3. Флавоноиды. Система генов биосинтеза флавоноидов у ячменя и пшеницы

1.3.1. Общая характеристика флавоноидных соединений

Флавоноиды (соединения также называемые биофлавоноиды) представляют разнородную группу вторичных растительных метаболитов фенольной природы. Название этих компонентов связано с латинским словом «flavus», что означает «жёлтый». В дополнение к жёлтым, флавоноидные пигменты окрашивают растительные ткани в розовый, красный, синий,

фиолетовый и коричневый цвета. Определённые флавоноидные пигменты ответственны за окраску не только цветов и плодов (в меньшей степени – стеблей и корней) многих видов растений, но и за цвет осенних листьев (Grotewold, 2006; Gould et al., 2008). Однако значительная доля флавоноидных соединений бесцветна.

В пути биосинтеза флавоноидов синтезируются несколько основных групп соединений: халконы, флавоны, изофлавоны, флаваноны, флавонолы, флаван-3-ол, проантоцианидины и антоцианы (Рисунок 6). Биологические функции и механизмы действия этих соединений весьма разнообразны. Различные флавоноиды играют важную роль в метаболизме растений как регуляторы роста и защиты от ультрафиолетового излучения, экстремальных температур, засухи и других факторов абиотического стресса (Grotewold, 2006; Pourcel et al., 2007). Кроме того, данные молекулы защищают растения от болезнетворных микробов и вредителей. Например, травоядных насекомых и млекопитающих может отталкивать вкус, придаваемый листьям некоторыми флавоноидными соединениями. Однако яркая окраска цветков растений, обусловленная флавоноидными пигментами антоцианами, напротив, помогает привлекать насекомых-опылителей, а окраска плодов – травоядных млекопитающих – распространителей семян (Landi et al., 2015). Цвет растительных тканей зависит не только от структуры самих соединений и pH среды, но и от того, в каких условиях развиваются растения, так как при стрессе (биотическом и абиотическом) концентрация данных пигментов возрастает (Grotewold, 2006; Gould et al., 2008; Lev-Yadun et al., 2008; Di Ferdinando et al., 2013).

Однако данные фенольные компоненты важны не только для растений. Растительная пища, богатая определёнными флавоноидами, является источником соединений, полезных для здоровья человека и домашних животных. Обнаруженная в первой половине XX века биоактивность флавоноидов вызвала большой интерес к этим соединениям.

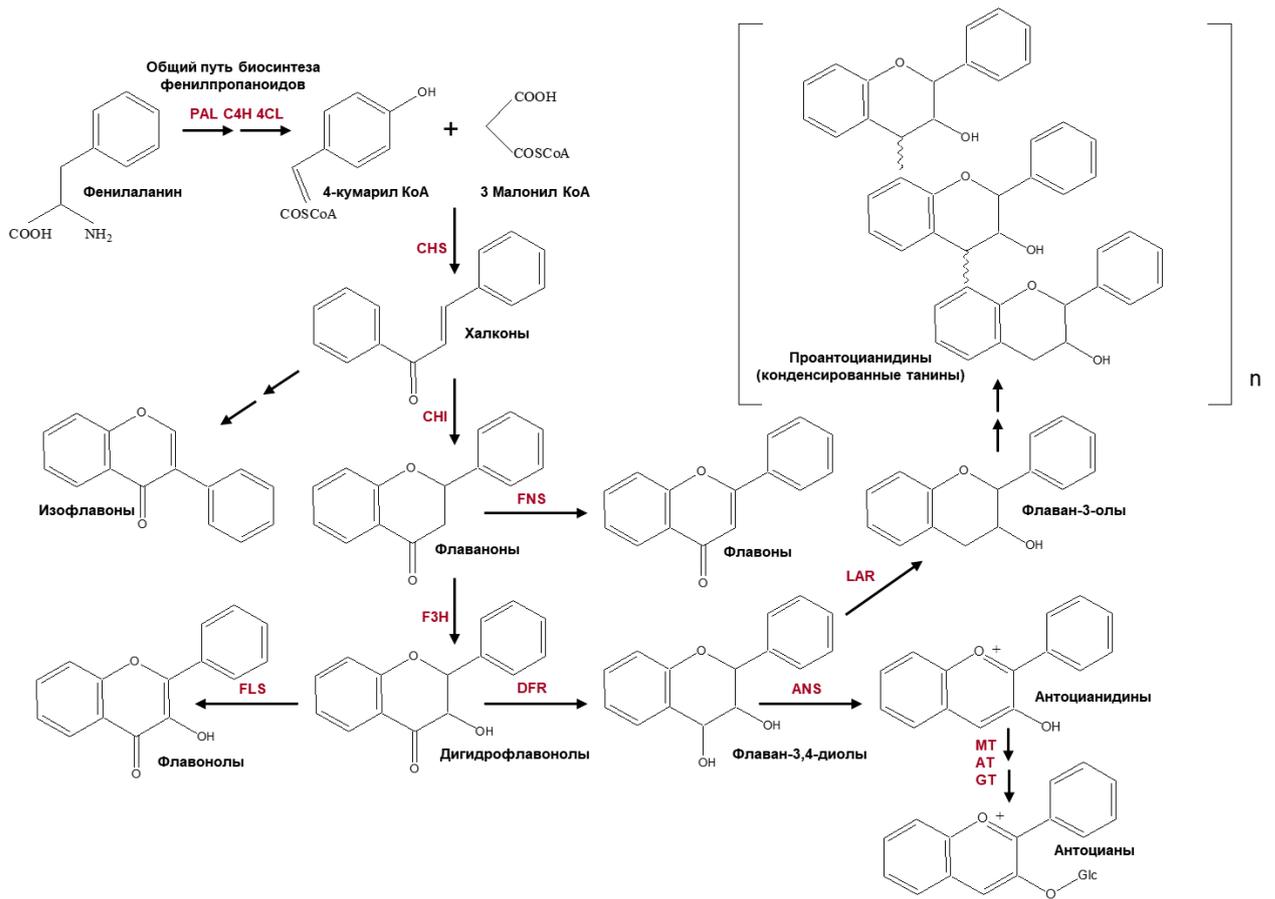


Рисунок 6. Схема биосинтеза флавоноидов. Ферменты: ANS – антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHS – халконфлаванонизомераза; DFR – дигидрофлавонол 4-редуктаза; F3H – флаванон 3-гидроксилаза; FLS – флавонолсинтаза; FNS – флавоносинтаза; LAR – лейкоантоцианидинредуктаза.

За последние 25 лет появилось множество исследований, подтверждающих полезность флавоноидов, в частности, антоцианов, для человека (Vinson et al., 1995; Rice-Evans et al., 1996; Van Acker et al., 1996; Velioglu et al., 1998; Nijveldt et al., 2001; Dewanto et al., 2002; Pourmorad et al., 2006; Balasundram et al., 2006; Podsędek, 2007; Tripoli et al., 2007; Szajdek et al., 2008; Tapas et al., 2008; Sharififar et al., 2009; Krishnaiah et al., 2011; Carocho et al., 2013; Borges Bubols et al., 2013; Shahidi et al., 2015; Аджиева и др., 2015; Ayeleso et al., 2016; De Beer et al., 2017). Например, французский национальный

институт сельскохозяйственных исследований Phenol-Explorer, появившийся в 2010 году, содержит информацию не только о содержании фенолов (к которым относятся флавоноиды и антоцианы) в ~ 450 продуктах питания, но также предоставляет имеющиеся данные о том, что известно о метаболизме этих соединений (<http://phenol-explorer.eu/>).

Антоцианы обладают широким спектром биологической активности. Они способны индуцировать защитные ферментные системы человека. Их также называют «модификаторами биологической реакции». Поскольку они обладают защитным эффектом против многих инфекционных (бактериальных и вирусных) и дегенеративных заболеваний, обезвреживая потенциально повреждающих ткани молекулы, а также сосудоукрепляющим действием, их потребление часто связывают с уменьшением риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака (в том числе рак лёгких и молочной железы), а также возрастных нейродегенеративных заболеваний (Yousuf et al., 2016; Li et al., 2017). Богатая антоцианами растительная пища является источником полезных для здоровья соединений, а зерно злаковых растений, таких как ячмень и пшеница, в отличие от других источников флавоноидов (плодовые и ягодные) отличается большей длительностью хранения и более частым употреблением.

Флавоноиды можно рассматривать как производные бензо- γ -пирона (хромона) (Рисунок 7а), основа которых – углеродная структура, состоящая из ароматических колец с общим составом C₆-C₃-C₆, где кольца А и В соединены фрагментом С. В зависимости от положения кольца В, данную группу соединений можно разделить на три класса: флавоноиды (истинные флавоноиды, эуфлавоноиды, 2-фенил бензопираны), изофлавоноиды (3-бензопираны) и неофлавоноиды (4-бензопираны) (Рисунок 7б). У этих групп соединений, как правило, имеется общий предшественник, и, следовательно, они структурно и генетически связаны (Grotewold, 2006).

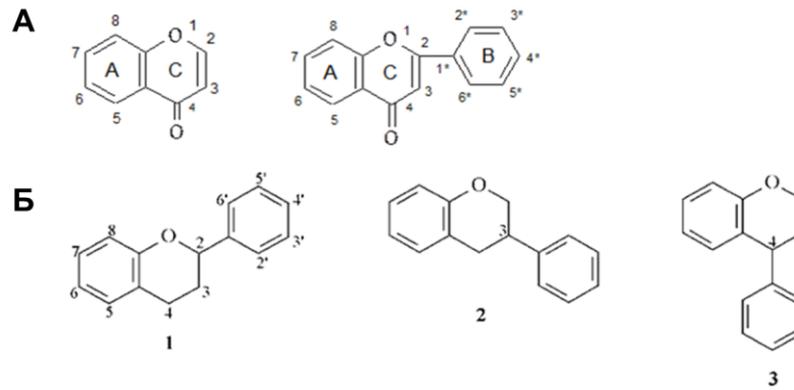


Рисунок 7. а) Структура бензо- γ -пирона (слева) и углеродная структура флавонов (справа); б) Классы флавоноидов в зависимости от положения арильного радикала: 1. – эуфлавоноиды (положение 2), 2. – изофлавоноиды (положение 3), 3. – неофлавоноиды (положение 4).

Множественность возможных модификаций флавоноидов приводит к более чем 6500 различных соединений из этого класса (Grotewold, 2006). Флавоноиды могут быть модифицированы путём гидроксирования, метилирования или О-гликозирования гидроксильных групп, а также путём С-гликозирования атома углерода флавоноидного скелета. Кроме того, к флавоноидным молекулам могут ковалентно присоединяться алкильные группы, а иногда с основным скелетом конденсируются дополнительные кольца. Например, гидроксирование В-кольца, характерное для большинства растений, происходит при участии ферментов флавоноид 3'-гидроксилаза (F3'H) и флавоноид 3',5'-гидроксилаза (F3'5'H), благодаря чему образуются соединения красно-фиолетового и голубого цвета, соответственно (Zhang et al., 2014) (Рисунок 8).

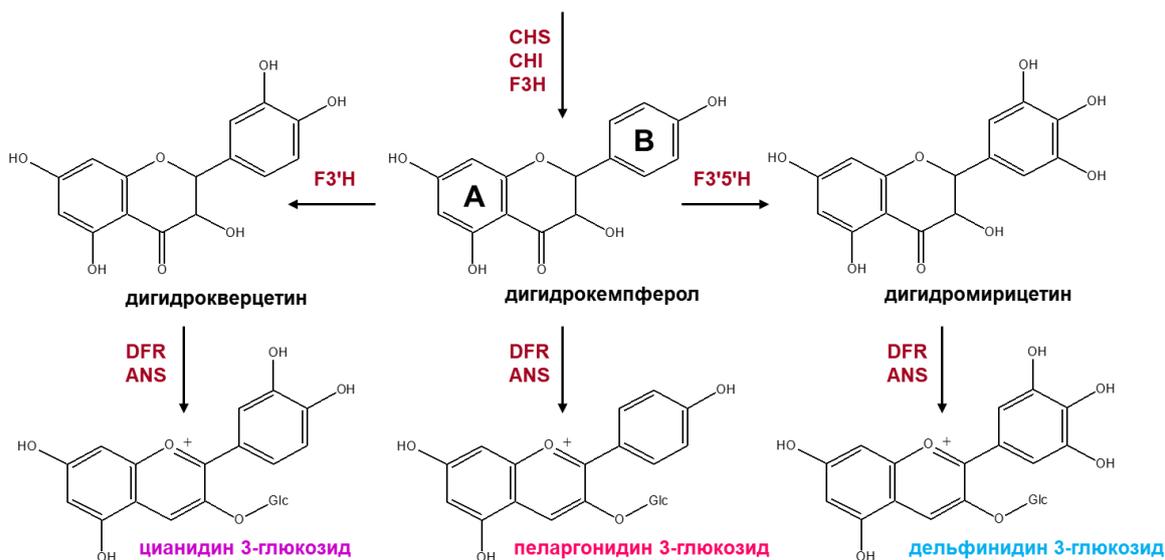


Рисунок 8. Схема биосинтеза антоцианов, отличающихся гидроксильрованием В-кольца. Ферменты: ANS – антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаваноноизомераза; CHS – халконфлаванонизомераза; DFR – дигидрофлавонол 4-редуктаза; F3H – флаванон 3-гидроксилаза; F3'H – флавоноид 3'-гидроксилаза; F3'5'H – флавоноид 3',5'-гидроксилаза; FLS – флавонолсинтаза.

1.3.1.1. Биосинтез флавоноидных соединений

Биосинтез флавоноидов – один из самых полно охарактеризованных метаболических путей у растений (Winkel-Shirley, 2001; Khlestkina, 2013b). Биосинтез всех флавоноидных соединений, в том числе антоцианов, начинается с фенилаланина, который в результате активности ферментов фенилпропаноидного пути фенилаланинаммиаклиазы (PAL), циннамат 4-гидроксилазы (C4H) и 4-кумарат:КоА лигазы (4CL) преобразуется в 4-кумарил КоА (КоА-эфир коричной кислоты) (Рисунок 6). Далее, при конденсации одной молекулы 4-кумарил КоА и трёх молекул малонил-КоА, полученных благодаря метаболизму жирных кислот, при участии фермента халконсинтаза (CHS) образуются халконы – предшественники всех флавоноидов (Рисунок 6).

Для синтеза антоцианидинов – предшественников пигментов антоцианов – требуется активность ещё шести ферментов: халконфлаванонизомеразы (CHI), флаванон-3-гидроксилазы (F3H), флавоноид 3'-гидроксилазы (F3'H), флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F3'5'H), дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR) и антоцианидинсинтазы (ANS, также известная как LDOX – лейкоантоцианидин диоксигеназа) (Рисунки 6 и 8). Далее ферменты, относящиеся к классам метилтрансфераз (MT) и ацилтрансфераз (AT), преобразуют антоцианидины в антоцианы. Структура антоцианидинов по своей природе нестабильна, поэтому в природе эти пигменты накапливаются исключительно как гликозилированные формы (антоцианы), связываясь с такими молекулами сахара, как глюкоза, рамноза и арабиноза при помощи ферментов гликозилтрансфераз (GT).

1.3.1.2. Генетическая регуляция биосинтеза флавоноидных пигментов

Многочисленные факторы опосредуют экспрессию структурных генов флавоноидов, в том числе различные факторы транскрипции, включая Myb (myeloblastosis) (Dubos et al., 2010). Первыми идентифицированными белками с MYB-доменами были вирус миелобластоза птиц *v-Myb* и его клеточный гомолог *c-Myb* (Klempnauer et al., 1982; Lipsick, 1996). Белки Myb регулируют различные клеточные процессы, включая рост и дифференцировку клеток, реакцию стресса и биосинтез вторичных метаболитов (Martin et al., 1997; Feller et al., 2011; Xu et al., 2015).

Семейство Myb представляет собой одну из наиболее распространённых групп TF, описанных у растений. Белки Myb имеют две отдельные области: консервативный N-терминальный ДНК-связывающий домен Myb, длина которого приблизительно 52 аминокислотных остатка, который образует спиральную структуру, и неконсервативный C-концевой регион, который отвечает за регуляторную активность белка (Feller et al., 2011).

Общим для всех факторов Myb является наличие от одного до четырёх неполных Myb повторов (R), которые могут функционировать вместе или по отдельности при связывании ДНК или белок-белковых взаимодействиях, соответственно. Основываясь на числе повторов в домене Myb, данное семейство можно разделить на четыре класса: 1R, R2R3, 3R и 4R Myb белки (Dubos et al., 2010). Семейство R2R3-Myb составляет самое большое семейство генов TF растений. Оно играет важную роль в регуляции экспрессии каталитических ферментов, в том числе при биосинтезе флавоноидных пигментов антоцианов (Allan et al., 2008; Feller et al., 2011) (Рисунок 9). Мутации в генах Myb часто приводят к отсутствию экспрессии генов и к потере пигментации, что иллюстрируется появлением неокрашенных разновидностей растений, таких как виноград *Vitis vinifera* (Kobayashi et al., 2004), яблоня *Malus × domestica* (Espley et al., 2007) и различные представители цитрусовых *Citrus* (Butelli et al., 2017) и др.

Часто различные R2R3-Myb регулируют биосинтез фенилпропаноидов, взаимодействуя с белками bHLH (basic helix-loop-helix) (Grotewold, 2005). Белки данного семейства образуют второй по величине класс TF растений. Данный класс белков был обнаружен в 1989 году, когда выяснилось, что ген *MyoD* имеет общую консервативную область кДНК с членами семейства *mus* и семейством *daughterless* (da), *achaete-scute* и *twist* дрозофилы (Murre et al., 1989). Оказалось, что эта консервативная область кодирует белковый мотив, который необходим для связывания ДНК и димеризации. Эти TF были объединены в одно надсемейство bHLH.

Домен bHLH высоко консервативен. При длине около 60 аминокислот он состоит из двух функционально различных областей (Рисунок 9). N-концевая основная область содержит 13-17 аминокислот, среди которых обычно шесть основных остатков, функция которых связываться с палиндромным гексануклеотидным ДНК-мотивом E-боксом – CANNTG, таким как G-box (CACGTG), в промоторах генов-мишеней. Спираль-петля-спираль (HLH) область состоит из двух амфипатических α -спиралей, в основном состоящих

из гидрофобных аминокислот, которые соединены с помощью петли переменной длины. Белки, содержащие HLH мотив, часто образуют гомо- или гетеродимеры с другими белками bHLH, что является необходимым условием для распознавания ДНК. Белок bHLH является весьма важным и для R2R3-Myb, поскольку они, взаимодействуя друг с другом, образуют транскрипционные комплексы с промоторами биосинтетических генов. Для кукурузы (*Zea mays*) было отмечено, что белок P1 MYB в отсутствие bHLH не способен активировать гены биосинтеза антоцианов, в то время как MYB12 арабидопсиса регулирует биосинтез флавонолов без взаимодействия с bHLH (Grotewold et al., 2000; Mehrrens et al., 2005).

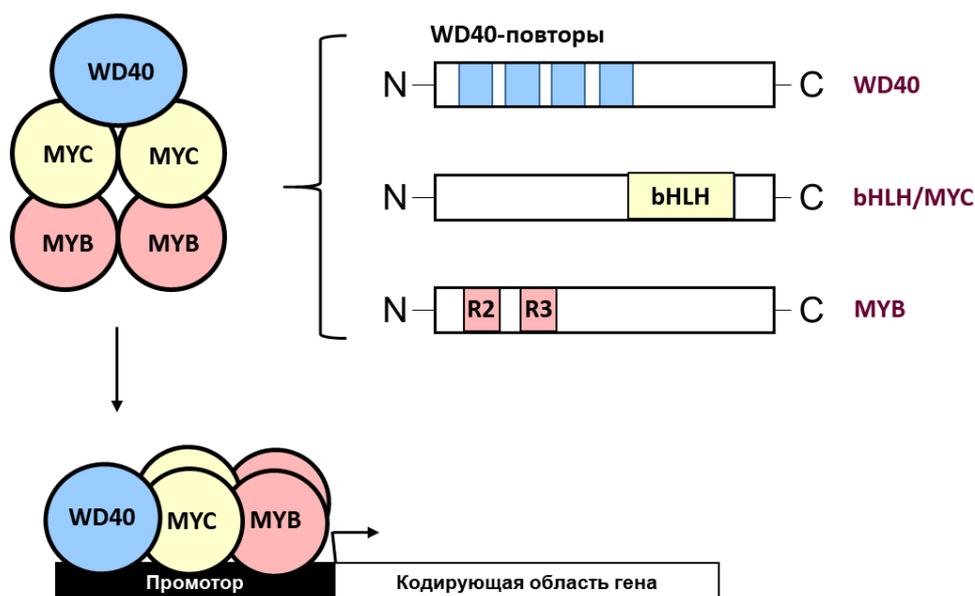


Рисунок 9. Структура белков MYB, bHLH/MYC и WD40, образующих регуляторный комплекс MBW. Розовым цветом обозначены несовершенные повторы R2 и R3 белка MYB. Жёлтым обозначен консервативный домен белка bHLH. Синим цветом обозначены WD-повторы белка WD40.

В отличие от ветви флавонолов, биосинтез антоцианов, как правило, регулируется комплексом, в котором взаимодействуют факторы транскрипции Myb, bHLH и WD40, при этом bHLH в данном комплексе

представлен белком типа Мус (myelocytomatosis) (Winkel-Shirley, 2002). Вместе данные ТФ образуют комплексы Myb-Мус-WD40 (Myb-bHLH-WD40 – MBW), которые до сих пор были описаны только у растений (Рисунок 9) (Walker et al., 1999; Baudry et al., 2004; Li, 2014). Первые 200 аминокислот bHLH необходимы для взаимодействия с факторами транскрипции Myb, а последующие 200 аминокислотных остатков взаимодействуют с белками WD40 (Pattanaik et al., 2010). Белки WD имеют от четырёх до восьми несовершенных тандемных повторов и взаимодействуют с другими белками через повторяющуюся область WD (Neer et al., 1994) (Рисунок 9). При этом Myb отвечает за специфичность активации транскрипции, а WD40 и Мус реагируют на изменение внешних стимулов, тем самым создавая гибкую систему активации транскрипции для ряда генов (Vaillau et al., 2002; Stracke et al., 2001, 2007; Lindemose et al., 2013).

Кроме синтеза антоцианов, комплекс MBW также контролирует образование корневых волосков и трихом надземных тканей у некоторых растений (Baudry et al., 2004; Broun, 2005; Feller et al., 2011; Patra et al., 2013). Паттерн экспрессии и ДНК-связывающая специфичность белков MYB и, в некоторой степени, белков bHLH определяют множество активируемых генов, в то время как белки WD40, вероятно, обладают более общей ролью в регуляторном комплексе (Hichri et al., 2010).

1.3.2. Флавоноидная пигментация у ячменя и пшеницы

Пигментация большинства зерновых культур соответствует «Закону гомологичных рядов в наследственной изменчивости», который был сформулирован в Н. И. Вавиловым (Вавилов, 1967). В нем говорится, что виды и роды, которые генетически тесно связаны, обычно характеризуются сходными рядами генетической изменчивости. Так, сходный диапазон окраски встречается не только у пшеницы (*Triticum*) и ячменя (*Hordeum*), но и у ржи (*Secale*), овса (*Avena*), риса (*Oryza*) и кукурузы (*Zea*) (Abdel-Aal et al., 2006). У

ячменя красно-фиолетовую антоциановую окраску могут иметь основание растения, стебель, листовые пластинки, листовое влагалище, ушки листового влагалища, ости, колосковые чешуи и разные слои зерновки (Lundqvist et al., 2003; Шоева и др., 2018) (Рисунок 10). В перикарпе и алейроновом слое зерна могут синтезироваться антоцианы, придавая зерну красно-фиолетовую и голубую окраски, соответственно (Harlan, 1914; Аджиева и др., 2016). Проантоцианидины (конденсированные танины), синтезируясь в оболочке зерновки, могут придавать ему красно-коричневую пигментацию (Aastrup et al., 1984). У пшеницы в дополнение ко всем перечисленным органам антоциановая окраска наблюдается также в coleoptile растения (Khlestkina, 2013).

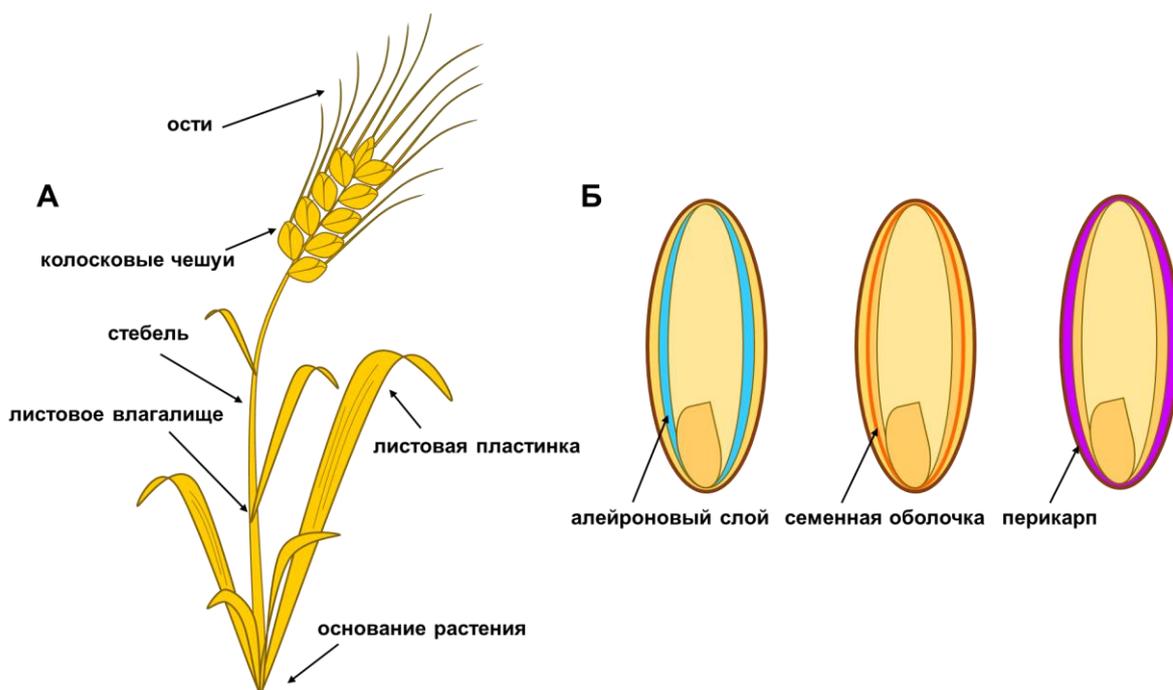


Рисунок 10. Изображение органов растения (а) и тканей зерновки (б), в которых могут накапливаться флавоноидные пигменты (по Шоева и др., 2018).

Перикарп и семенная оболочка являются материнскими тканями, однако алейроновый слой является частью триплоидного эндосперма, где две дозы генетической информации поступают от материнского организма и одна от

отцовского. Поскольку фиолетовый цвет зерна характерен для перикарпа зерновки, то после скрещивания невозможно наблюдать расщепление потомства по окраске зерен в одном и том же колосе. В случае же триплоидного эндосперма, где голубой пигмент накапливается в алейроне, его проявление зависит от дозы гена. Таким образом, проявление данного признака напрямую связано с генотипом отцовского растения (Lachman et al., 2017).

1.3.2.1. Красно-коричневая окраска семенной оболочки

Красно-коричневый цвет зерен встречается у большинства европейских и американских сортов пшениц (Lachman et al., 2017) в связи с тем, что данный тип пигментации обуславливает меньшую активность гидролитических ферментов и лучшую устойчивость зерна к прорастанию (Debeaujon et al., 2000; Nimi et al., 2011). С другой стороны, наличие проантоцианидинов в зерновке пивоваренных сортов ячменя нежелательно, поскольку они образуют коллоидное помутнение пива, снижая его качество (von Wettstein, 2007), поэтому изучение генов, контролирующих накопление проантоцианидинов в зерновке ячменя было актуальной задачей.

У ячменя наличие проантоцианидиновой окраски контролируется геном *Ant28*, локализованным в дистальном районе хромосомы 3HL (Шоева и др., 2018). Проантоцианидиновый цвет зерновки пшеницы контролируется доминантными аллелями генов *R-1* (*Red grain color*), расположенных на длинных плечах трех гомеологичных генов хромосом 3AL, 3BL и 3DL (*R-A1*, *R-B1* и *R-D1*, соответственно) (Khlestkina, 2013). При этом наличие только одного доминантного локуса достаточно для того, чтобы изменить цвет зерна на красно-коричневый. Однако красный цвет – это аддитивный признак, и его интенсивность зависит от количества доминантных аллелей генов *R-1* (Lachman et al., 2017).

В 2011 году было установлено, что гены *Ant28* и *R-1* кодируют регуляторные факторы R2R3-Myb (Himi et al., 2011), регулирующие экспрессию структурных генов биосинтеза флавоноидов *CHS*, *CHI*, *F3H* и *DFR* (Himi et al., 2005, 2011). Было установлено, что идентифицированные гены имеют высокую степень гомологии не только между собой, но и с R2R3-Myb-кодирующим геном *TT2* арабидопсиса, который контролирует биосинтез проантоцианидинов в семенной оболочке растения (Nesi et al., 2001). Гены *Ant28* и *R-1* были переименованы как *Hvmyb10* и *Tamyb10*, соответственно (Himi et al., 2011). Остальные компоненты MBW комплекса, регулирующего биосинтез проантоцианидинов у пшеницы и ячменя, к настоящему моменту еще не открыты.

1.3.2.2. Голубая окраска алейронового слоя

Окраску алейронового слоя ячменя связывают с наличием пяти функциональных генов *Blx* (*Non-blue aleurone xenia*). Три гена (*Blx1*, *Blx3*, *Blx4*) тесно сцеплены и расположены на хромосоме 4HL; *Blx2* расположен на хромосоме 7HL (Finch et al., 1978). Цвет алейронового слоя может быть изменён с голубого до розового или красного тогда, когда комплементарные доминантные аллели присутствуют в локусах *Blx1*, *Blx2*, *Blx3* и *Blx5*, но не в *Blx4*.

Биосинтез антоцианов в алейроновом слое мягкой пшеницы находится под контролем генов *Ba* (*Blue aleurone*). При этом окраска алейронового слоя пшеницы возможна только при замещении одной из её хромосом или её части на хромосому тетраплоидной пшеницы *Triticum boeoticum* (ген *Ba2*, хромосома 4A^m) или диплоидного пырея: *Agropyron trichophorum*, *Thinopyrum intermedium* / *Agropyron glaucum* или *Thinopyrum ponticum* / *Agropyron elongatum* (ген *Ba1*, хромосома 4B) (Zeven, 1991). Кроме этого, предполагается наличие другого гена, контролирующего окраску алейронового слоя, на хромосоме 4D от *Th. ponticum* (Lachman et al., 2017). В 2017 году был

изолирован ген *Ba1*, перенесенный в геном мягкой пшеницы из *Th. ponticum* (Li et al., 2017). Было показано, что данный ген, обозначенный *ThMYC4E*, гомологичен генам четвертой гомеологической группы хромосом *T. aestivum* и кодирует bHLH фактор транскрипции Мус-типа. Остальные регуляторные гены *WD40*, *Myb* и *bHLH*, контролирующие накопление голубых антоцианов в алейроновом слое пшеницы и ячменя, до настоящего момента выявлены не были.

1.3.2.3. Фиолетовая окраска перикарпа

У ячменя регуляцию биосинтеза фиолетовых антоциановых пигментов в перикарпе, а также в цветковых чешуях, контролируют локусы *Pre* (*Red lemma and pericarp*) (Franckowiak et al., 1997; Matthews et al., 2003). В работе Jia с коллегами (Jia et al., 2016) было продемонстрировано, что локус *Pre2* на хромосоме 2HL – это ген *HvMyc1 / HvAnt2*, кодирующий транскрипционный фактор с доменом bHLH Мус-типа (Cockram et al., 2010). Сорегулятором данного гена может являться фактор R2R3-Myb, кодируемый геном *HvMpc1 / HvAnt1* (7HS), который активирует структурные гены (Cockram et al., 2010; Shoeva et al., 2014, 2015; Himi et al., 2015).

Фиолетовый цвет зерновки пшеницы ассоциирован с генами фиолетовой пигментации *Pp* (*purple pericarp*) (Khlestkina, 2013). Гены *Pp* были картированы: *Pp1* на коротком плече хромосомы 7В и *Pp3* на длинном плече хромосомы 2А (Dobrovolskaya et al. 2006; Khlestkina et al., 2013), при этом для *Pp1* известен гомеологический набор генов (*Pp-A1* на 7AS, *Pp-B1* на 7BS и *Pp-D1* на 7DS). Гены *Pp1* и *Pp3* являются комплементарными и кодируют разные типы ТФ (Gordeeva et al., 2015). В исследовании Shoeva et al. (2014) было установлено, что ген *Pp3* – это Мус-кодирующий ген *TaMyc1*, контролирующий синтез фиолетовых антоциановых пигментов в перикарпе пшеницы (Shoeva et al., 2014b). Кандидатом для *Pp1* является ген *TaCl-D1*,

кодирующий ТФ Муб-типа (расположен на коротком плече хромосомы 7D) (Himi et al., 2015; Jiang et al., 2018).

1.3.2.4. Окраска вегетативных органов

Ген *HvMpc1* / *HvAnt1* (7HS) Муб-типа, вероятно, является регулятором биосинтеза антоцианов не только в перикарпе ячменя, но в стебле, листовом влагалище, ушках листового влагалища, остях и колосковых чешуях (Jendestrid et al., 1978; Franckowiak et al. 2012; Шоева и др., 2018). Мутации в локусе *HvMyc1* / *HvAnt2* (2HL) приводят к отсутствию пигментации во всех вегетативных органах, включая вышеперечисленные части растения (Jendestrid et al., 1978). Это указывают на то, что *HvMpc1* и *HvMyc1* участвуют в формировании окраски не только перикарпа, но и вегетативных органов.

У пшеницы три гена *Rc* (*red coleoptile*), контролирующие окраску coleoptile, локализованы на хромосомах 7A (Sears, 1954), 7B (Gale et al., 1971) и 7D (Jha, 1964). В 2013 году они были точно картированы в гомеологичных положениях хромосом 7AS, 7BS и 7DS и обозначены *Rc-A1*, *Rc-B1* и *Rc-D1*, соответственно (Khlestkina, 2013).

Три гомеологичных гена, необходимых для появления окраски стебля (*purple culm*, *Pc-A1*, *Pc-B1*, *Pc-D1*), три гомеологичных гена пигментации листовых оболочек (*purple leaf sheaths*, *Pls-A1*, *Pls-B1*, *Pls-D1*) и три гомеолога окраски листовых пластин (*purple leaf blades*, *Plb-A1*, *Plb-B1*, *Plb-D1*) оказались тесно сцепленными с генами окраски coleoptile *Rc-A1*, *Rc-B1* и *Rc-D1* (Khlestkina, 2013). Два гена, определяющих цвет пыльников (*purple anther*, *Pan-A1* и *Pan-D1*), картированы в хромосомах 7A (Blanco et al., 1998) и 7D (Khlestkina et al., 2009) на небольшом расстоянии от *Rc-A1* и *Rc-D1*, соответственно.

Ген *Ra* (*red auricle*), контролирующий окраску ушек листового влагалища, локализован на хромосоме 7D мягкой пшеницы между

микросателлитными локусами *Xgwm0044* и *Xgwm1481*, несущими кластер генов *Rc-D1*, *Pc-D1*, *Pls-D1* и *Plb-D1* (Khlestkina et al., 2014).

Подводя итог, подчеркнем, что к настоящему моменту известны не все факторы R2R3-Myb и bHLH Mус-типа, регулирующие синтез флавоноидов, в частности, антоцианов, в вегетативных и генеративных органах хозяйственно ценных злаков ячменя и мягкой пшеницы, что затрудняет развитие фундаментальных исследований и прикладных работ. Также в геномах этих организмов до сих пор не идентифицирован важный компонент регуляторного MBW-комплекса – WD40. Кроме этого, остается невыясненной роль эпигенетических механизмов в регуляции тканеспецифической экспрессии дублицированных копий генов биосинтеза флавоноидов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Идентификация и анализ генов *R2R3-Myb*, *bHLH Myc* и *WD40*

Поиск гомологичных последовательностей генов *R2R3-Myb*, *bHLH Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae был сделан с использованием алгоритма BLASTN в базах данных неаннотированных геномных последовательностей ячменя (IPK Barley BLAST Server: http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley_ibsc/), пшеницы и её сородичей (URGI: <https://urgi.versailles.inra.fr/>; CerealDB: <http://www.cerealsdb.uk.net>) на основании последовательностей: (1) генов *R2R3-Myb* ячменя *HvAnt1 / HvMpc1-H1* (GenBank: KP265977) и пшеницы *TaC1 / TaMpc1-1* (GenBank: AB983540, AB983541, AB983542), (2) генов *bHLH Myc*-типа ячменя *HvAnt2 / HvMyc1* (GenBank: KX035100) и пшеницы *TaMyc1 / TaMyc-A1* (GenBank KJ747954), (3) генов *WD40* кукурузы *ZmPAC1* (GenBank: AY115485) и сорго *SbTan1* (GenBank: JX122967). Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с использованием программы MULTALIN v5.4.1 (Corpet, 1988). Экзон-интронная структура генов была предсказана с помощью программы FGENESH+ (Solovyev, 2001) и подтверждена с помощью последующего секвенирования кДНК. *In silico* анализ промоторных последовательностей проводился с помощью базы данных New PLACE (Higo et al., 1999). Аннотацию функциональных доменов осуществляли с помощью InterPro: protein sequence analysis & classification (Finn et al., 2016). Моделирование третичной структуры предсказанных аминокислотных последовательностей выполнялось с помощью SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Кластерный анализ, расчёт отношения Ka / Ks и расчёт времени дивергенции выполнялся с помощью программного обеспечения MEGA v6.06 (Tamura et al., 2013); построение филогенетических деревьев осуществляли методами UPGMA и Neighbour-joining с бутстрэп-поддержкой 500, на полученных изображениях показаны данные бутстрэп \geq

50%. Для калибровки временной шкалы использовалось время дивергенции ячменя и кукурузы (50-60 млн лет назад), ячменя и пшеницы (10-12 млн лет назад) яблока и арабидопсиса (104-108 млн лет назад) (Salse et al., 2009; Cheng et al., 2012; Subburaj et al., 2016).

2.2. Растительный материал

Растительный материал, использованный в данном исследовании, представлен в Приложении 1. Он включает семнадцать сортов и линий аллогексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (BBAADD), одну тетраплоидную линию *T. durum* (BBAA), две родительские линии (OWB-Dom и OWB-Rec) ячменя *H. vulgare* (HH) и 92 растения из популяции OWB (Oregon Wolfe Barleys – удвоенные гаплоидные рекомбинантные линии, полученные от скрещивания OWB-Dom x OWB-Rec), три почти изогенные линии ячменя Bowman (Bowman's near-isogenic lines, NILs), девять сортов ячменя из коллекции ИЦиГ «ГенАгро» (Новосибирск, Россия) и два образца ячменя, предоставленных ИПК GenBank (Gatersleben, Германия). Для выделения ДНК и РНК из стебля, алейрона, перикара и цветковой чешуи, растения выращивались в теплицах ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия) при 16-часовом световом дне при температуре 20-25°C. Для выделения ДНК и РНК из coleoptile и корней, семена пшеницы проращивали в климатической камере «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH) на влажной фильтровальной бумаге при 12-часовом фотопериоде при 20°C. Для имитации условий стресса проросшие однодневные проростки подвергали воздействию 0 (контроль), 200 mM NaCl (засоление) и 15% полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) (засуха). Эксперименты проводились в трёх биологических повторностях для каждого эксперимента.

2.3. Выделение антоцианов и измерение их относительного содержания

Антоцианы были выделены из замороженных и гомогенизированных колеоптиле на 4-й день после прорастания на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в климатической камере «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH) в условиях 12 ч светового дня при постоянной температуре +20°C. Выделение производилось в 1% растворе HCl / метанол согласно протоколу Khlestkina et al. (2011). Выделение и измерение относительного количества антоцианов выполняли в трёх биологических повторностях. Относительное содержание антоцианов оценивалось спектрофотометрическим методом на приборе «SmartSpec™Plus» (BioRad) при длине волны 530 нм. Различия между генотипами были оценены с помощью теста Манна-Уитни (*U*-test), значение $p \leq 0,01$ считалось значимым.

2.4. Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК проводили с использованием метода Plaschke et al. (1995) с модификациями. Свежую растительную массу (проростки пшеницы или свежие листья ячменя) гомогенизировали в 700 мкл буфера для экстракции (100 mM Трис-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 50 mM ЭДТА; 1.25% SDS; 3.8% Na₂S₂O₅) с помощью гомогенизатора ES-8300 (ЭКРОС), после инкубировали на водяной бане при 60°C в течение 30 минут. При добавлении смеси хлороформ / изоамиловый спирт (24:1) содержимое пробирки перемешивали и центрифугировали в течение 30 минут при 12000 об/мин. Геномную ДНК осаждали, добавляя к водной фазе 1 мл охлаждённого при -20°C этилового спирта с последующим центрифугированием в течение 15 минут при 12000 об/мин. Выделенную ДНК растворяли в 50 мкл буфера TE (10 mM трис-HCl, pH 8.0; 1 mM ЭДТА). Концентрация выделенной ДНК оценивалась с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

2.5. Выделение ДНК для бисульфитного секвенирования. Обработка бисульфитом натрия

Тотальную геномную ДНК для бисульфитного секвенирования выделяли из coleoptile, корней и перикарпов с использованием DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) согласно методике производителя. ДНК выделялась: из coleoptile (слабая антоциановая окраска) и корней (отсутствие пигментации) генотипа Саратовская 29 (*i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3*, *Saratovskaya 29*, *S29*) на пятый день после прорастания; из перикарпов почти изогенных линий S29 (неокрашенный перикарп) и *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^P* (темно-фиолетовый перикарп) на стадии ранней восковой спелости (Приложение 1). С использованием набора EpiTest kit (QIAGEN) один мкг геномной ДНК каждого образца обрабатывался бисульфитом натрия согласно инструкции производителя.

2.6. Выделение РНК, синтез комплементарной ДНК (кДНК)

Выделение РНК из перикарпа и алейрона проводилось на стадии восковой спелости через 55-75 дней после посева. Отделение тканей осуществлялось с помощью скальпеля. Тотальная РНК из coleoptile, корней, перикарпа, цветковой чешуи и стебля (с листовыми оболочками) была выделена с помощью ZR Plant RNA MiniPrep™ (Zymo Research): из coleoptile и корней на пятый день после прорастания; из перикарпа, цветковой чешуи и стебля через 45-50 дней после посева. РНК из алейрона была выделена с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Полученная РНК была обработана RNase-free DNase set (QIAGEN). Концентрация выделенной РНК измерялась с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.). По матрице РНК была синтезирована одноцепочечная кДНК с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Все процедуры выполнялись согласно протоколам производителей используемых наборов.

2.7. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и дизайн праймеров

Аmplификацию геномной ДНК и кДНК проводили в 20 мкл ПЦР-смеси. Реакционные смеси содержали 70 нг ДНК-матрицы, по 1 нг каждого праймера, 0,25 мМ каждого dNTP, 1x реакционного буфера (67 мМ TrisHCl, pH 8,8, 2 мМ MgCl₂, 18 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Твин-20) и 1U Taq полимеразы. После первоначальной денатурации при 94°C в течение 2 мин было проведено 35 циклов при 94°C в течение 1 мин, 50-60°C в течение 1 мин и 72°C в течение 0,5-2 мин с последующей финальной элонгацией при 72°C в течение 5 мин. Дизайн праймеров был выполнен с использованием программы Oligo Primer Analysis Software v.7 (для ПЦР, <https://www.oligo.net/>) и MethPrimer (для ПЦР с бисульфитной обработкой, <http://www.urogene.org/methprimer/>) на основании последовательностей генов, идентифицированных в базах данных неаннотированных геномных последовательностей в настоящей работе. Последовательности используемых праймеров приведены в Приложении 2.

2.8. Количественная ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией)

Количественная ОТ-ПЦР проводилась на кДНК при использовании набора реагентов «QuantiTect SYBR Green Kit» (QIAGEN) и системы ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл в следующих условиях: преденатурация – 15 минут при 95°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 58-64°C; 15 секунд при 95°C. Графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц строились на основе трёх последовательных 3-кратных разведений. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась

количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену убиквитин (*Ubiquitin*); праймеры были взяты в Himi et al., 2005. Каждый образец запускался в трех технических вариантах. Различия между генотипами были проверены с помощью теста Манна-Уитни (*U-test*) или с помощью критерия Краскела-Уоллиса, при которых значение $p \leq 0,01$ считалось значимым. Последовательности праймеров, используемых для определения относительного уровня экспрессии генов, приведены в Приложении 2.

2.9. Гидролиз продуктов ПЦР с помощью эндонуклеаз рестрикции

Для идентификации аллелей выявленных генов проводился гидролиз продуктов ПЦР-реакции эндонуклеазами рестрикции *BseI* I и *Hga* I (СибЭнзим). Фермент добавлялся из расчета 1 е.а. на 1 мкг ДНК в присутствии: SE-буфера Y (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл BSA, 50% глицерин) для эндонуклеазы *BseI* I; SE-буфера B (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 мкг/мл BSA, 50% глицерин) для *Hga* I. Смесь инкубировали 1 час при температуре 65 °C и 37 °C, соответственно. Продукты гидролиза разделяли в 5% и 2% агарозном геле с высоким разрешением (Sigma), соответственно.

2.10. Электрофорез в агарозном геле

Электрофоретический анализ геномной ДНК, продуктов ПЦР и продуктов гидролиза эндонуклеаз рестрикции проводили в 1-5% агарозном геле (HydraGene Co.), приготовленном на буфере TAE (40 mM Трис-HCl, pH 8,0; 20 mM ацетат натрия; 1 mM ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. В карманы агарозного геля наносили по 20 мкл реакционной смеси с добавлением 0,05% ксиленцианола, 0,05% бромфенолового синего и 5% глицерина. В качестве маркера молекулярного

веса ДНК использовали маркер «100 bp» (МЕДИГЕН). Электрофорез вели при напряжении 5-10 В/см в течение 40 минут-3 часов. Изображение геля получали с помощью прибора Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System (BioRad) с использованием УФ-излучения.

2.11. Выделение ДНК из агарозного геля и секвенирование

Аmplицированные фрагменты выделялись из 1% агарозного геля с использованием набора реагентов «MinElute Gel Extraction Kit» (QIAGEN) согласно инструкции производителя. Секвенирование ДНК проводилось с помощью набора для секвенирования «ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit» (5×BigDye; Perkin Elmer) с использованием праймеров, приведенных в Приложении 2. Секвенирующая реакция проводилась в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 90 нг ДНК-матрицы, 10 пмоль праймера, 1,5 мкл 5X Big Dye 3.1 и 3 мкл 5X буфера. Условия реакции: предцикл – 5 минут при 95°C; денатурация – 40 сек при 95°C; отжиг - 30 сек при 55°C; полимеризация - 4 минуты при 60°C; число циклов – 25. Полученные продукты осаждали добавлением 15 мкл воды, 6 мкл 10 М ацетата аммония и 90 мкл 96% этанола; полученную смесь центрифугировали в течение 20 минут при 12000 об/мин. Полученный осадок промывали 250 мкл 80% этанола и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Анализ образцов проводился на базе ЦКП «Геномика» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.12. Бисульфитное секвенирование

Анализ паттернов метилирования нуклеотидных последовательностей был осуществлён с набором EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) согласно инструкции производителя. Амплицированные ПЦР-продукты для каждого образца клонировали с использованием набора для молекулярного

клонирования ПЦР-продуктов PCR Cloning Kit (QIAGEN) согласно предлагаемой методике. Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием набора Биосилика по протоколам производителя. Плазмидную ДНК 10 положительных клонов для каждого продукта ПЦР амплифицировали в обоих направлениях с помощью праймеров M13 и набора «ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit» (5×BigDye; Perkin Elmer) с последующим анализом амплифицированного продукта согласно протоколу п. 2.11.

2.13. Молекулярно-генетическое картирование генов

Молекулярно-генетическое картирование идентифицированных генов ячменя проводилось с помощью картирующей популяции OWB на основании сопоставления с данными о RFLP (restriction fragment length polymorphism; полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) и SSR (simple sequence repeat; простые повторы, простые повторяющиеся последовательности) локусах данной популяции (Costa et al., 2001). Генетические карты были построены с помощью программы MAPMAKER 2.0 (Lander et al., 1987) с использованием функции Косамби.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Идентификация и исследование структурной организации генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40*, потенциально регулирующих синтез флавоноидов в трибе Triticeae

3.1.1. Поиск и филогенетический анализ гомологичных последовательностей регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40*

***R2R3-Myb*.** В геномах мягкой пшеницы (*T. aestivum*), её сородичей (диплоидные и тетраплоидные пшеницы рода *Triticum*, а также диплоидные виды рода *Aegilops* с геномами родственными геномам В и D пшеницы) и ячменя (*H. vulgare*) был проведён поиск последовательностей, гомологичных известным регуляторным генам биосинтеза антоцианов *R2R3-Myb*: ген ячменя *HvAnt1* (хромосома 7HS) и гомеологичные гены мягкой пшеницы *TaC1* (хромосомы 7AS, 7BS и 7DS).

На основании сведений, ранее полученных с помощью Саузерн-блот анализа нуллитетрасомных линий пшеницы (Li et al., 1999), известно, что в хромосомах 4-й гомеологической группы имеются гомологи генов *TaC1* пшеницы. Действительно, в геноме мягкой пшеницы суммарно было выявлено 8 копий гена *TaC1*, обозначенных на Рисунке 11 «*TaMpc1*» в соответствии с впервые введенным в работе Li et al. (1999) названием *R2R3-Myb*-кодирующих генов – гомологов гена *ZmC1* кукурузы.

Выявленные 3 копии в хромосомах 7AS, 7BS и 7DS, названные *TaMpc1-A1*, *TaMpc1-B1*, *TaMpc1-D1* (ранее *TaC1*) в соответствии с правилами обозначения гомеологичных генов (Каталог генных символов пшеницы: McIntosh et al., 2017), имеют ортологи у остальных изученных видов, в том числе у ячменя – ген *HvMpc1-H1* (ранее *HvAnt1*), локализованный на коротком плече хромосомы 7Н (Приложение 3; Рисунок 11, розовый кластер).

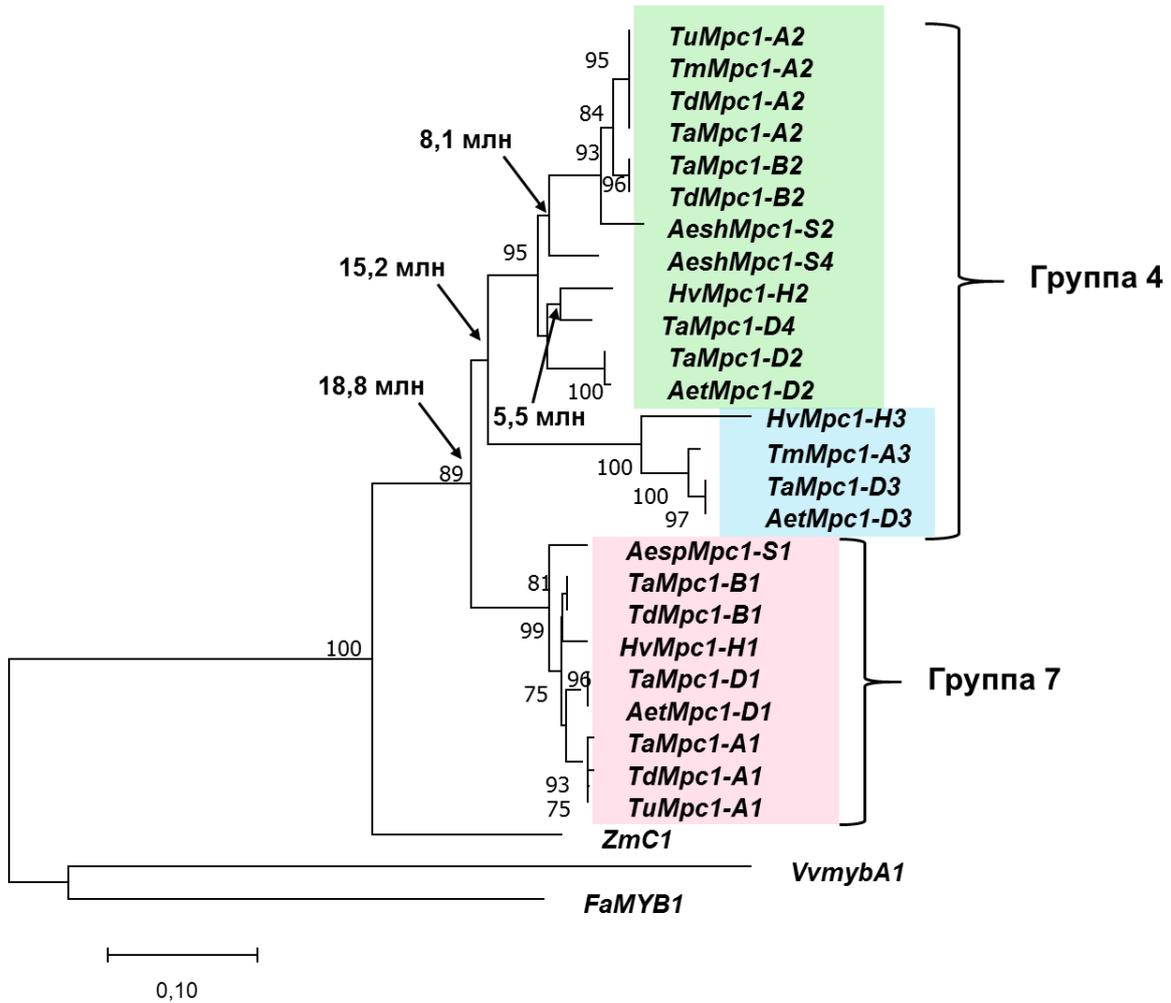


Рисунок 11. Анализ филогенетического сходства генов *Mpc1* (CDS). MEGA 6.06, метод Neighbor-Joining. Стрелками обозначено время образования и дивергенции копий генов; млн - миллион лет назад. *ZmC1* - NM_001112540, *VvmybA1* - AB097923, *FaMYB1* - AF401220

На длинном плече хромосомы 4Н ячменя была обнаружена последовательность, гомологичная гену *HvMpc1-H1* (69,0% идентичности) (Приложение 3; Рисунок 11, зелёный кластер). Данная копия была обозначена *HvMpc1-H2*. Вторая последовательность, также выявленная на хромосоме 4НЛ ячменя, имеет 73.1% идентичности с *HvMpc1-H1* (Приложение 3; Рисунок 11, синий кластер). Эта копия была обозначена *HvMpc1-H3*.

Среди выявленных копий генов *TaMpc1-1* в хромосомах 4-й гомеологической группы у мягкой пшеницы (1 копия в 5А в районе

транслокации 5A / 4A; 1 копия в 4B и 3 копии в 4D), три представляют гомеологичный набор *TaMpc1-A2*, *TaMpc1-B2*, *TaMpc1-D2* – результат дубликации гена *Mpc1* в хромосомах 4 и 7 общего предка трибы Triticeae, которая произошла, согласно данным расчётам, около 18,8 млн лет назад (Приложение 3; Рисунок 11). Эти копии сохранились у остальных изученных диплоидных и тетраплоидных видов. Уровень идентичности между копиями *Mpc1-1* и *Mpc1-2* составляет около 70 %.

Ещё одна копия – это ген *TaMpc1-D3* мягкой пшеницы и его ортологи у ячменя (*HvMpc1-H3*), у диплоидного *T. monococcum* и у *Ae. tauschii*. Образование данного кластера, как показали расчёты, произошло 15,2 млн лет назад. Кроме того, обнаруженная в копия *Mpc1-4* образовалась, вероятно, независимо в геноме D мягкой пшеницы и в S-геноме у одного из изученных видов *Aegilops* 5,5 и 8,1 млн лет назад, соответственно (Приложение 3; Рисунок 11).

bHLH-Myс. На основании нуклеотидных последовательностей ортологичных регуляторных генов биосинтеза антоцианов *TaMyс1* пшеницы (KJ747954) и *HvAnt2 / HvMyс1* ячменя (KX035100), локализованных на длинных плечах хромосом 2A и 2H, соответственно, помимо данных генов, в геноме ячменя была обнаружена ещё одна копия гена *HvMyс1*, расположенная на хромосоме 4HL (Приложение 3; Рисунок 12, розовый кластер). Предсказанная полная кодирующая последовательность данного гена имеет 70,8% идентичности с *HvMyс1*. Обнаруженная копия была обозначена *HvMyс2*.

В геноме мягкой пшеницы на основании последовательностей *TaMyс1* и *HvMyс1* было выявлено 11 генов *Myс*: шесть в хромосомах второй гомеологической группы (включая ранее выделенный ген *TaMyс1*), четыре в хромосомах четвёртой гомеологической группы хромосом и один в хромосоме 5A в районе транслокации 5A / 4A (Приложение 3; Рисунок 12).

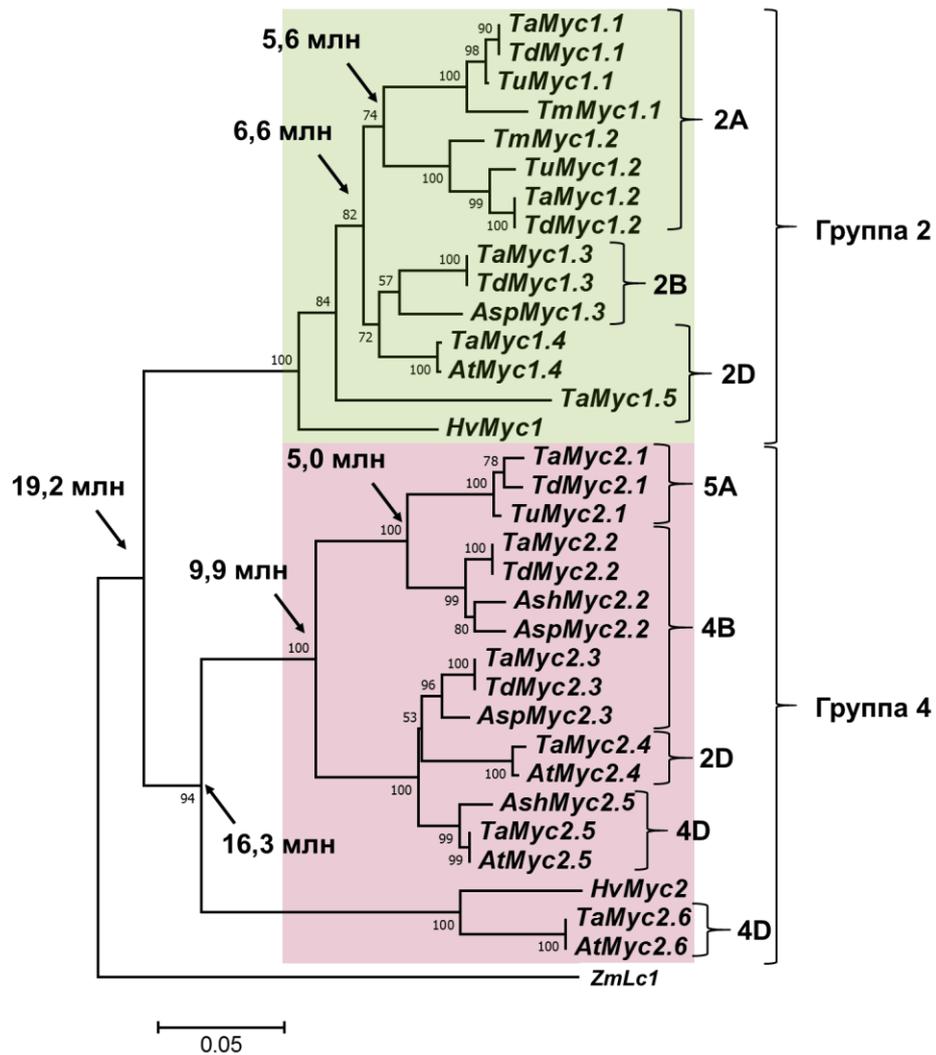


Рисунок 12. Анализ филогенетического сходства *Мус*-подобных генов (CDS). MEGA 6.06, Neighbor-Joining. Зелёный цвет – гены 2-й гомеологической группы хромосом. Розовый цвет - гены 4-й гомеологической группы хромосом. Стрелками обозначено время образования и дивергенции копий генов; млн - миллион лет назад. *ZmLc1* - M26227

Гены второй гомеологической группы хромосом *T. aestivum* имеют между собой высокий уровень идентичности (84-99%). Уровень идентичности полных кодирующих последовательностей последовательностей четвёртой гомеологической группы хромосом, а также гена хромосомы 5A (*TaMyc2.1*) и одного гена второй гомеологической группы (*TaMyc2.4* – хромосома 2D) находится в пределах 67-68%. Все обнаруженные гены оказались

локализованными на длинных плечах соответствующих хромосом. Номера присваивались исходя из эволюционного родства генов и их принадлежности к геномам А, В и D (Приложение 3).

Гомологичные последовательности данных генов были идентифицированы в геномах тетраплоидной пшеницы и диплоидных видов, близких к геномам А, В и D (Приложение 3; Рисунок 12). Помимо обнаруженных последовательностей, было установлено, что у диплоидных *Ae. speltoides* и *Ae. sharonensis* (родственные геному В) в составе второй хромосомы имеется дополнительная копия гена *Мус*, которая была утрачена тетра- и гексаплоидными пшеницами (Приложение 3).

Анализ времени дивергенции идентифицированных последовательностей показал, что первый акт дупликации гена *Мус* у общего предка трибы Triticeae (хромосома 2/4) произошёл 19,2 млн лет назад (Рисунок 12). Далее в геномах видов, относящихся к родам *Triticum* и *Aegilops*, происходили новые последовательные дупликации, как правило, внутрихромосомные. В хромосоме 2 до дивергенции родов *Triticum* и *Aegilops* у диплоидного предка в интервале 5,5-6,6 млн лет назад произошла дупликация в хромосоме 2 (Приложение 3; Рисунок 12). Обе копии сохранились и передались по наследству тетра- и гексаплоидной пшенице, за исключением В-генома (см. выше).

В хромосоме 4 основные дупликационные события происходили до дивергенции *Triticum* и *Hordeum*, а именно: (1) дупликация, которая привела к образованию генов *HvMyc2* у ячменя и *Мус2.6* у предка D-генома – 16,3 млн лет назад и (2) дупликация, в результате которой благодаря последующим актам внутрихромосомных удвоений образовались два кластера *Мус2.1 / Мус2.2* и *Мус2.3 / Мус2.4 / Мус2.5* – 9,9 млн лет назад, т.е. примерно во время дивергенции *Triticum* и *Hordeum*, но до расхождения *Triticum* и *Aegilops* – 5,0 млн лет назад согласно данным расчётам (Рисунок 12).

WD40. Гены, кодирующие транскрипционные факторы типа WD40, вовлеченные в биосинтез флавоноидов, ранее в геноме пшеницы, ячменя или

других представителей трибы Triticeae, идентифицированы не были. В настоящей работе данные гены были обнаружены впервые на основе гомологии с WD40-кодирующими генами кукурузы *ZmPAC1* и сорго *SbTan1*. Копии, обозначенные *WD40-1*, кластеризуются с геном *ZmPAC1*, выявлены на длинном плече в хромосомах 6-й группы у всех изученных видов (Приложение 3; Рисунок 13, серый кластер).

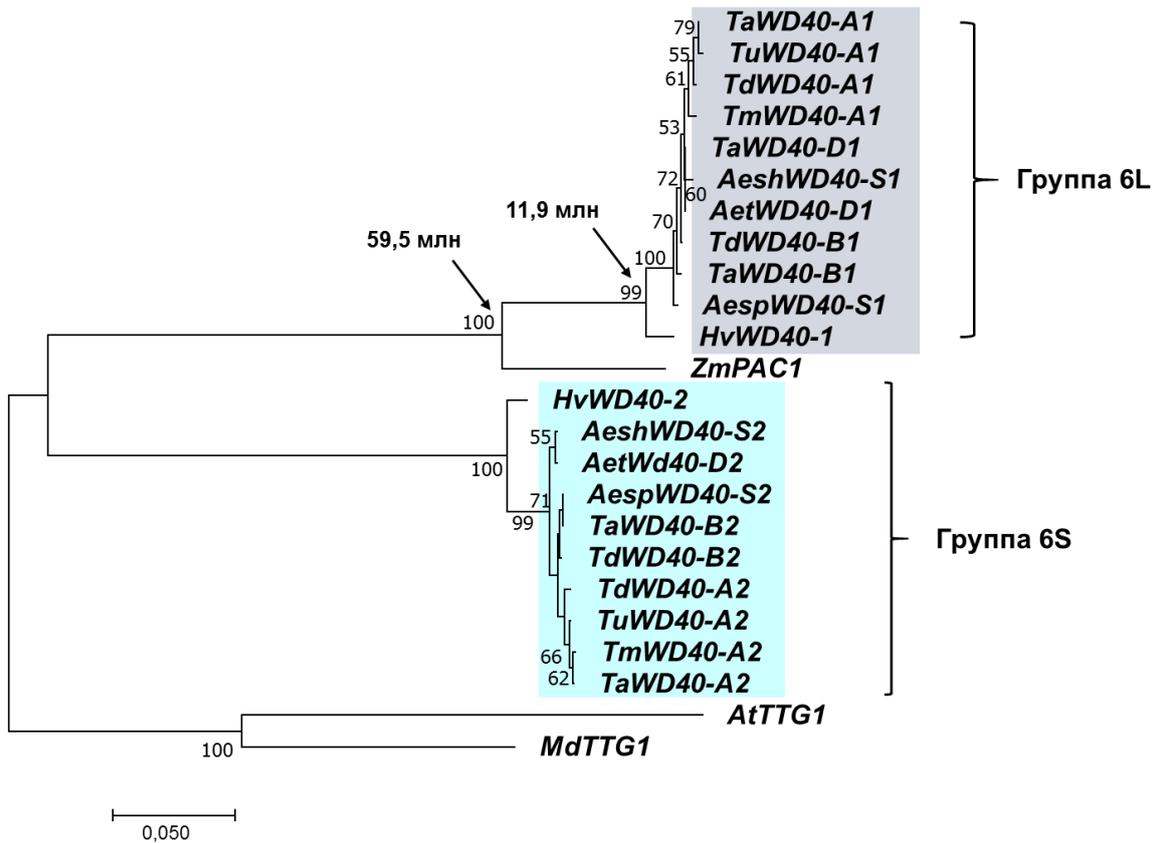


Рисунок 13. Анализ филогенетического сходства генов *WD40* – гомологов *PAC1* кукурузы (CDS). MEGA 6.06, UPGMA. ANT2 – HM370387. Серый цвет – гены 6L гомеологической группы хромосом. Голубой цвет - гены 6S гомеологической группы хромосом. Стрелками обозначено время образования и дивергенции копий генов; млн - миллион лет назад. *AtTTG1* – AK227211, *MdTTG1* – GU173814, *ZmPAC1* – AY115485.

На коротком плече хромосом 6-й группы также была выявлена ещё одна копия - *WD40-2*. Соответствующие ей последовательности были обнаружены у всех проанализированных видов, за исключением мягкой пшеницы – в её

геноме копия *TaWD40-D1* не идентифицирована (Приложение 3; Рисунок 13, голубой кластер). Уровень идентичности между полными кодирующими последовательностями копий генов *WD40-1* и *WD40-2* составляет около 60%. При этом было установлено, что дупликация *WD40-1 / WD40-2* произошла намного раньше дивергенции *Triticum* и *Hordeum* (оценено как 11,9 млн лет назад) и *Zea* и *Triticum* (оценено как 59,5 млн лет назад), возможно, на ранних этапах эволюции однодольных растений (Рисунок 13).

3.1.1.1. Соотношение Ka / Ks гомологичных последовательностей

Для идентифицированных генов было подсчитано число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (Ka), число синонимичных замен на синонимичные сайты (Ks) и отношение Ka / Ks . Соотношения несинонимичных и синонимичных замен варьировались между (1) 0,171-0,251 и 0,290-0,332 для идентифицированных генов *R2R3-Myb*, (2) 0,141-0,215 и 0,186-0,277 для генов *bHLH* *Мус*-типа и (3) 0,115-0,127 и 0,346-0,396 для *WD40*-кодирующих генов, соответственно (Приложение 4). Используя формулу Ka / Ks , было определено, что идентифицированные последовательности типа *R2R3-Myb*, *bHLH-Мус* и *WD40* находятся под действием стабилизирующего отбора, поскольку в среднем значение Ka / Ks для *Myb* близко к 0,70, для *bHLH* – к 0,79, а для *WD40* – к 0,21, при этом последовательности типа *WD40* в большей степени находятся под действием стабилизирующего отбора, чем *Myb* и *bHLH* (Приложение 4).

На основании проведённого анализа были построены предполагаемые схемы образования дублицированных копий генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Мус* и *WD40*, объясняющие путь того, как в геномах анализируемых организмов образовалось такое число копий регуляторных генов, потенциально вовлечённых в биосинтез флавоноидов (Приложения 5-7).

3.1.2. Структурная организация идентифицированных генов

Все аннотированные гены *R2R3-Myb* имеют сайты, кодирующие мотивы R2 и R3 (IPR017930), которые характерны для данного подсемейства. Экзон-интронная структура обнаруженных копий (*Mrc1-1*, *Mrc1-2*, *Mrc1-3*, *Mrc1-4*) одинакова у всех проанализированных представителей трибы Triticeae и состоит из двух экзонов (Приложение 8). Для подтверждения структуры, а также для идентификации других возможных аллельных вариантов, данные гены были секвенированы: у пшеницы *TaMrc1-2*, *TaMrc1-3*, *TaMrc1-4* в сорте Саратовская 29; у ячменя *HvMrc1-H2* и *HvMrc1-H3* в почти изогенных линиях сорта Bowman и генотипах OWB-Dom и OWB-Rec. В кодирующих последовательностях этих генов не были выявлены мутации, приводящие к нарушению рамки считывания.

Обнаруженные последовательности *Myc* содержат как полные, так и частичные последовательности генов, поэтому полная структура была предсказана только для некоторых из них, и во всех случаях соответствовала структуре *TaMyc1* – полная кодирующая последовательность данного гена состоит из восьми экзонов, 6-й и 7-й экзоны содержат консервативный домен bHLH *Myc*-типа (IPR036638), необходимый для активации структурных генов путём связывания с ДНК и белком (Приложение 8). Для подтверждения этого, полные кодирующие последовательности генов *Myc-1* пшеницы и область bHLH-домена генов *Myc-2* пшеницы были ресеквенированы в сортах Саратовская 29 и Chinese Spring, а также кодирующие последовательности гена *HvMyc-2* ячменя в почти изогенных линиях сорта Bowman и генотипах OWB-Dom и OWB-Rec. Установлено, что у пшеницы и её сородичей все идентифицированные гены *Myc* содержат в своём составе домен bHLH и все являются консервативными в функционально значимых мотивах данного домена. Исключение представила последовательность *Myc1.5* (2D) как у *T. aestivum*, так и у *Ae. tauschii* (Приложение 9). В данном гене в bHLH домене в 144 положении последовательности ДНК произошла однонуклеотидная

делеция, которая привела к сдвигу рамки считывания и укорочению мотива bHLH. Поэтому данная последовательность исследовалась только в эволюционном аспекте.

Кроме того, были предсказаны возможные альтернативные варианты сплайсинга для двух *Myc* генов: *TaMyc1.2* и *TaMyc1.5*. Экспериментальная проверка с разработанными праймерами к данным генам у мягкой пшеницы с помощью ОТ-ПЦР его не подтвердила.

Сравнение последовательностей гена *HvMyc2* ячменя сорта Bowman (BW, отсутствие пигментации) в сравнении с его почти изогенной линией Intense blue aleurone (BA, голубая окраска алейронового слоя), отличающихся аллельным состоянием генов *Blx* хромосомы 4Н, контролирующих появление голубой пигментации алейрона, выявило одну однонуклеотидную делецию, находящуюся на 58 п.н. выше мотива bHLH, приводящую к сдвигу рамки считывания в неокрашенном генотипе BW (Приложение 10). Секвенирование данного гена у растений двуродительской картирующей популяции OWB-Dom x OWB-Res, а также девяти сортов ячменя из коллекции ИЦиГ «ГенАгро» (отсутствие пигментации) и двух образцов ячменя, предоставленных ИРК GenBank (голубая окраска алейрона) выявило ту же мутацию в неокрашенном родителе OWB-Res и ячменях коллекции ИЦиГ «ГенАгро» (Приложение 1).

Все выявленные последовательности генов *WD40* у представителей трибы Triticeae обладают характерными для данного семейства мотивами – повторами аминокислот, оканчивающихся мотивом W-D (триптофан-аспарагиновая кислота, IPR001680), но местоположение и число повторов между *WD40-1* и *WD40-2* различаются (Приложение 8). Какие-либо мутации в составе данных генов, приводящие к нарушению рамки считывания, при секвенировании в геноме мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 и ячмене в почти изогенных линиях сорта Bowman и сортах OWB-Dom и OWB-Res идентифицированы не были.

С помощью SWISS-MODEL была предсказана структура мономера белка WD40 для кукурузы (*ZmPAC1*), пшеницы (*TaWD40-A1*) и для ячменя (*HvWD40*). Структура соответствует 6-лопастному b-пропеллеру (Приложение 11), характерной для всех известных белков WD40 животных и растений.

3.1.2.1. Анализ промоторных областей

Анализ промоторов генов *Myb* (~ 600 пар оснований от старт-кодона) показал, что все идентифицированные последовательности имеют множество мотивов связывания ТФ Мус- и Муб-типа, а также сайты активации транскрипции, индуцированной светом, необходимые для биосинтеза флавоноидов (Приложение 12). Также в промоторах генов *HvMpc1-H2* и *HvMpc1-H3* при секвенировании в почти изогенных линиях Bowman (генотипы BW, BA, PLP (Purple lemma and pericarp)) были обнаружены одинонуклеотидные замены (Приложения 13 и 14). Кроме того, в промоторной части гена *HvMpc1-H3* была выявлена 17-нуклеотидная инсерция (CAGCAGAGCACTAGCTC) в генотипе OWB-Rec.

На основе промоторной последовательности гена *TaMyc1* пшеницы (GenBank: KJ747954) было осуществлено множественное выравнивание последовательностей для идентификации промоторных областей *Мус*-генов. Для анализа были выбраны участки ~350 п.н. от старта начала транскрипции *TaMyc1*. Множественное выравнивание последовательностей, а также анализ с использованием базы данных New PLACE для обнаружения отдельных элементов промоторов и их положения относительно друг друга выявили, что гены из второй гомеологической группы хромосом делятся на две подгруппы из-за особенностей их промоторных областей: *TaMyc1.1*, *TaMyc1.3*, *TaMyc1.5* (первая подгруппа) и *TaMyc1.2*, *TaMyc1.4* (вторая подгруппа) (Приложения 15 и 16). Последовательности в каждой подгруппе сохраняли общий набор регуляторных элементов, таких как сайты связывания транскрипционных факторов, элементы, чувствительные к стрессу, сайты активации

транскрипции, индуцированной светом. Основываясь на правилах обозначения гомеологичных генов, гены *Myc* были переименованы: *TaMyc1.1* (*TaMyc1*) – *TaMyc-A1*, *TaMyc1.2* – *TaMyc-A2*, *TaMyc1.3* – *TaMyc-B1*, *TaMyc1.4* – *TaMyc-D2*, *TaMyc1.5* – *TaMyc-D1*.

3.2. Анализ транскрипционной активности регуляторных генов *R2R3-Myb*, *bHLH* *Myc*-типа и *WD40* ячменя и пшеницы

3.2.1. Экспрессия генов *R2R3-Myb*, *bHLH* *Myc*-типа и *WD40* ячменя

Исследование относительного уровня экспрессии генов проводилось на кДНК тканей алейронового слоя, перикарпа, цветковых чешуй и стеблей почти изогенных линий сорта Bowman (BW, BA, PLP), контрастных по антоциановой пигментации (Приложение 1).

Анализ транскрипционной активности идентифицированных генов (*HvMyc2*, *HvMpc1-H2*, *HvMpc1-H3*, *HvWD40-1*, *HvWD40-2*) проводился в сравнении с ранее известными *bHLH* и *Myb* генами *HvMyc1* / *HvAnt2* и *HvMpc1-H1* / *HvAnt1*, соответственно (Рисунок 14). В данном исследовании был выявлен тканеспецифический паттерн экспрессии *bHLH*-кодирующего гена *HvMyc2* – он экспрессировался только в тканях алейронового слоя и цветковых чешуй, причём в линии BA, отличающейся от BW наличием голубых пигментов антоцианов в алейроновом слое, его экспрессия была выше в 8,6 раз (Рисунок 14). Ген *HvMyc1*, с другой стороны, отличался усиленной экспрессией в перикарпе и стебле ячменя, при этом его активность в стебле была высокой вне зависимости от окраски ткани (Рисунок 14).

Myb-кодирующий ген *HvMpc1-H1* характеризовался высоким уровнем экспрессии во всех проанализированных образцах (причём в линии PLP экспрессия была значимо выше), за исключением алейронового слоя (Рисунок 14). Ген *HvMpc1-H3*, напротив, отличался тканеспецифическим характером экспрессии – его активность находилась на высоком уровне в алейроновом

слое ячменя, при этом в окрашенном алейроне линии ВА экспрессия этого гена была в 8 раз выше, чем в неокрашенном образце (Рисунок 14). Ген *HvMpc1-H2* характеризовался высокой транскрипционной активностью в алейроновом слое, цветковых чешуях и стеблях, а его уровень экспрессии был выше в пигментированных тканях (Рисунок 14).

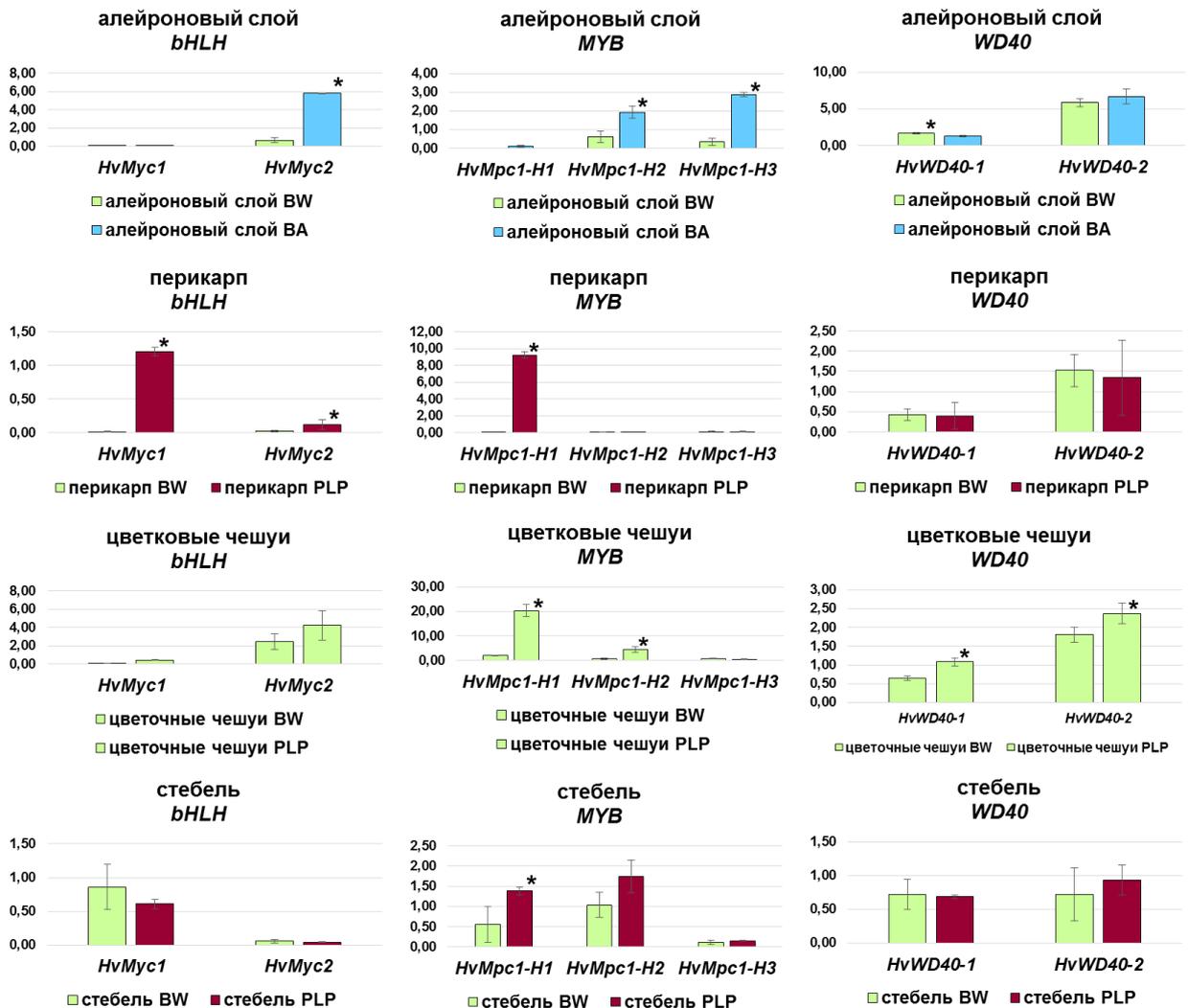


Рисунок 14. Относительный уровень мРНК генов в *HvMyc*, *HvMpc1* и *HvWD40* в алейроновом слое ячменя, перикарпе, цветковых чешуях и стеблях почти изогенных линий сорта Bowman. Цвет столбцов соответствует цвету анализируемой ткани. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась *U*-тестом. *различия статистически значимы между Bowman и NIL при $p \leq 0,05$.

Экспрессия генов *WD40* ячменя наблюдалась на высоком уровне во всех проанализированных образцах (Рисунок 14). Однако ген *HvWD40-2* в сравнении с *HvWD40-1* отличался повышенной активностью в алейроновом слое и перикарпе как окрашенной, так и неокрашенной почти изогенных линий Bowman.

3.2.2. Экспрессия генов *R2R3-Myb*, *bHLH* *Myc*-типа и *WD40* пшеницы

3.2.2.1. Анализ активности генов в coleoptile пшениц

Экспрессия *Myb*-кодирующих генов *TaMpc1-2*, *TaMpc1-3* и *TaMpc1-4* была проанализирована с использованием разработанных ген-специфических праймеров. Гены *TaMpc1-A2*, *TaMpc1-B2* и *TaMpc1-D2* продемонстрировали транскрипционную активность в coleoptile, ген *TaMpc1-D4* экспрессировался как в coleoptile, так и в перикарпе пшеницы. Однако все проанализированные гены не транскрибировались в корнях растения. Кроме того, ген *TaMpc1-D3* не экспрессировался ни в coleoptile, ни в перикарпе.

Используя количественную ОТ-ПЦР, был определён относительный уровень экспрессии данных генов в сортах и линиях пшеницы, отличающихся антоциановой пигментацией (Рисунок 15, Приложение 1). Было показано, что уровень экспрессии гена *TaMpc1-A2* меняется в зависимости от окраски coleoptile почти всех проанализированных образцов пшеницы. Ген *TaMpc1-B2* демонстрирует слабый уровень экспрессии в coleoptile всех проанализированных генотипов независимо от их пигментации. Экспрессия гена *TaMpc1-D4* также проявлялась независимо от цвета coleoptile, но в целом она была намного более сильной по сравнению с *TaMpc1-B2* (в генотипе *T. durum* экспрессия D-геномных генов не наблюдалась, так как в тетраплоидной пшенице отсутствует D-геном). Уровни экспрессии гена *TaMpc1-D2* значительно различались среди генотипов, однако эта вариация не была связана с цветом coleoptile (Рисунок 15).

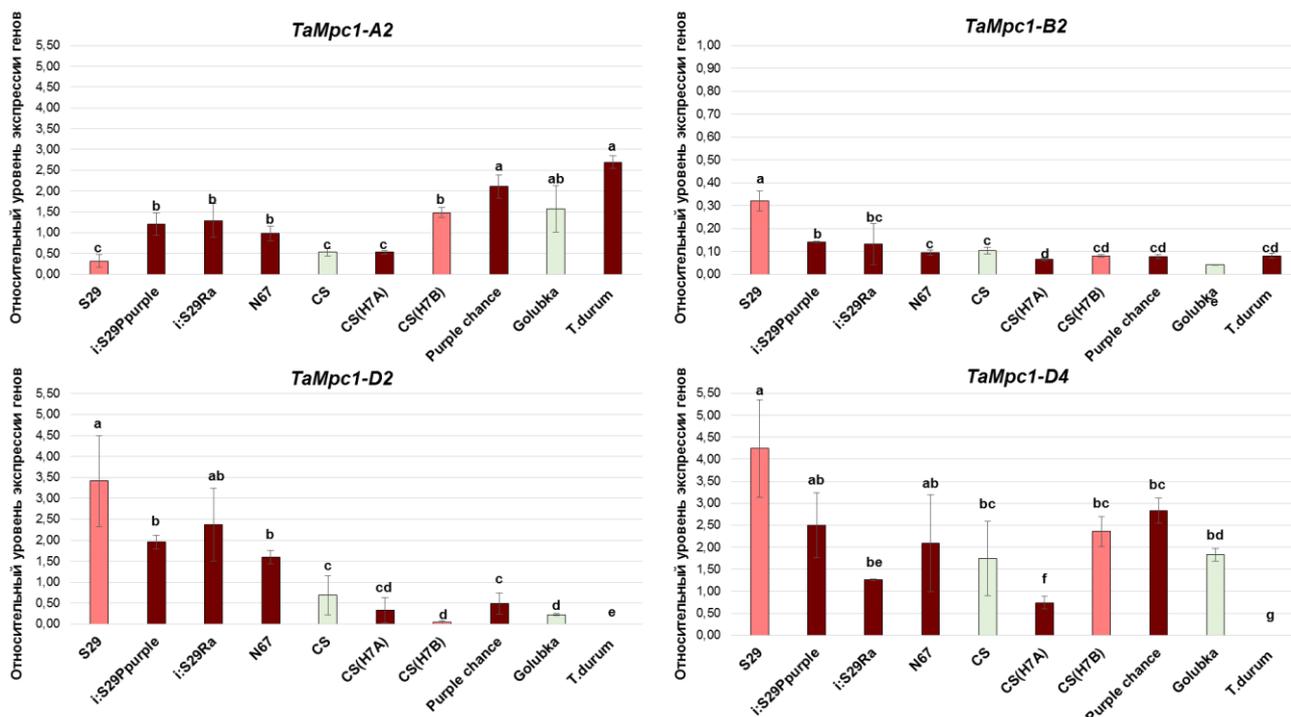


Рисунок 15. Относительный уровень мРНК генов *TaMpc1-2* и *TaMpc1-4* в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет колонки соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. *различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Также была проанализирована экспрессия генов *bHLH* типа *Myc* второй и четвёртой гомеологической группы хромосом. Ранее было показано, что ген *TaMyc-A1* участвует в биосинтезе антоцианов в перикарпе пшеницы, тогда как другие гены второй гомеологической группы хромосом (*TaMyc-A2*, *TaMyc-B1*, *TaMyc-D2*) неактивны в этой ткани (Shoeva et al., 2014b). Стоит отметить, что в корнях пшеницы данные гены также не экспрессируются. Чтобы исследовать, могут ли данные гены быть связаны с синтезом антоцианов в других частях растения пшеницы, была проведена количественная ПЦР с ген-специфическими праймерами к *TaMyc-A1*, *TaMyc-A2*, *TaMyc-B1* и *TaMyc-D2* в coleoptile сортов и линий пшеницы с зелёным (неокрашенным), светло-красным и темно-красным цветом (Рисунок 16, Приложение 1).

Было установлено, что экспрессия данных генов не соотносится с пигментацией coleoptile, однако экспрессия *TaMyc-A1* на 5-й день после прорастания семян была намного выше (почти в 8-15 и 13-25 раз, соответственно) в coleoptile двух генотипов *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3P* и Purple chance (носители доминантного аллеля *TaMyc-A1*) по сравнению со всеми другими генотипами (Рисунок 16). Высокий уровень экспрессии *TaMyc-A1* может объяснить появление тёмно-красного цвета coleoptile в *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3P* и Purple chance. Однако этот ген не может считаться основным регулятором накопления антоцианов в данном органе, поскольку генотипы с тёмно-красным цветом coleoptile (*i:S29Ra*, CS(Норе 7A), Новосибирская 67) не имеют сопоставимый уровень экспрессии *TaMyc-A1* (Рисунок 16).

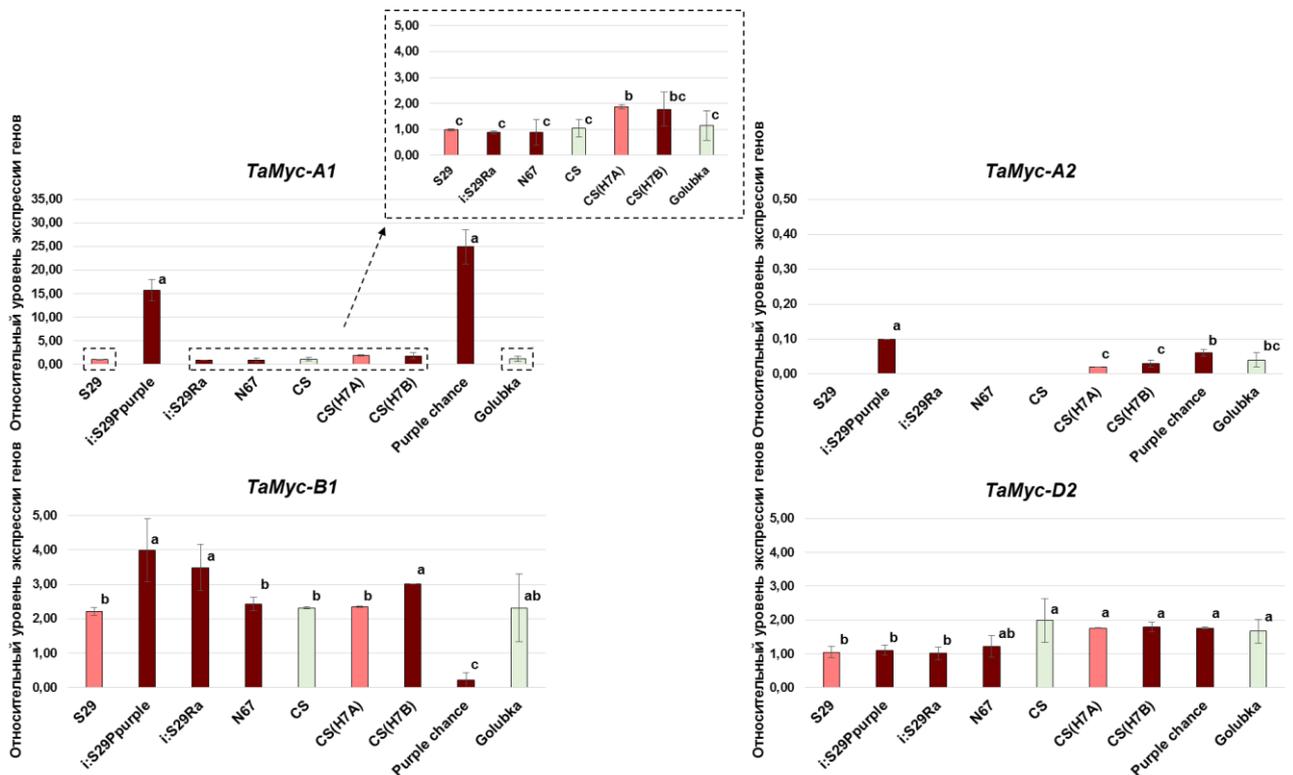


Рисунок 16. Относительный уровень мРНК генов *Myc* второй гомеологической группы хромосом в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет колонки соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. *различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Среди генов *Мус* четвёртой гомеологической группы хромосом транскрипционно активными в тканях coleoptile оказались только два: *TaMyc-2.1* и *TaMyc-2.5*, но в перикарпе зерновки или корнях у мягкой пшеницы данные гены не экспрессировались. Анализ относительного уровня экспрессии в coleoptile сортов и линий пшеницы показал, что уровень экспрессии данных генов значимо выше в сестринских линиях сорта Chinese Spring, однако связи между степенью пигментации coleoptile и уровнем экспрессии данных генов отмечено не было (Рисунок 17).

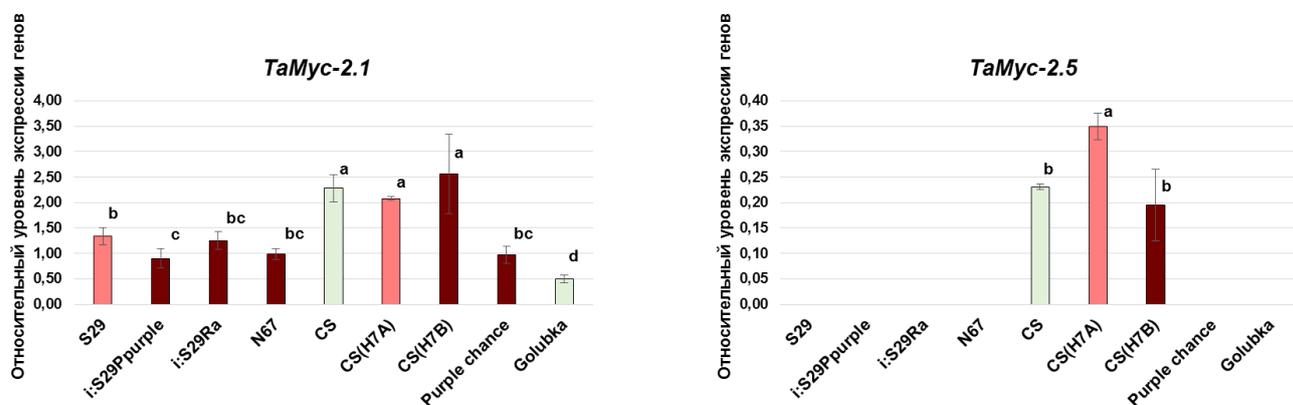


Рисунок 17. Относительный уровень мРНК генов *Мус* четвёртой гомеологической группы хромосом в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет колонки соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. *различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Используя ОТ-ПЦР, была оценена суммарная экспрессия генов *WD40* пшеницы в корне, coleoptile и перикарпе пшеницы Саратовская 29. Данные гены оказались транскрипционно активны во всех проанализированных тканях. Далее, с помощью количественной ПЦР, проведённой на кДНК coleoptile пшениц, было отмечено, что данные гены экспрессируются на высоком уровне во всех проанализированных генотипах со значимым

повышением уровня экспрессии в тетраплоидной пшенице *T. durum* TRI 15744 и гексаплоидной пшенице Голубка (Рисунок 18).

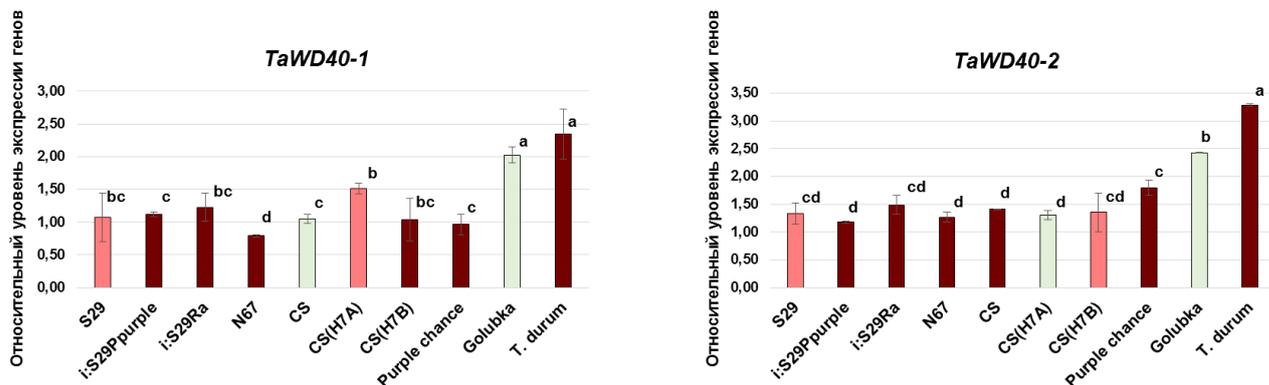


Рисунок 18. Относительный уровень мРНК генов *WD40* в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет колонки соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. *различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

3.2.2.2. Анализ экспрессии генов в перикарпе пшениц

Уровень экспрессии *TaMrc1-D4* был проанализирован в перикарпах линий пшеницы Саратовская 29, отличающихся присутствием доминантных генов *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3* (гены *TaMrc1-A1*, *TaMrc1-D1* и *TaMyc-A1*, соответственно), контролирующих биосинтез антоцианов в этой ткани (Приложение 1). Оказалось, что ген *TaMrc1-D4* интенсивно экспрессируется во всех генотипах, обладающих как пигментированным, так и неокрашенным перикарпом (Рисунок 19).

Для генов *TaWD40-1* и *TaWD40-2* была отмечена тенденция к увеличению уровня экспрессии в генотипах, несущих доминантные гены *TaMrc1-A1*, *TaMrc1-D1* и *TaMyc-A1*, т.е. обладающих интенсивной окраской перикарпа (Рисунок 19).

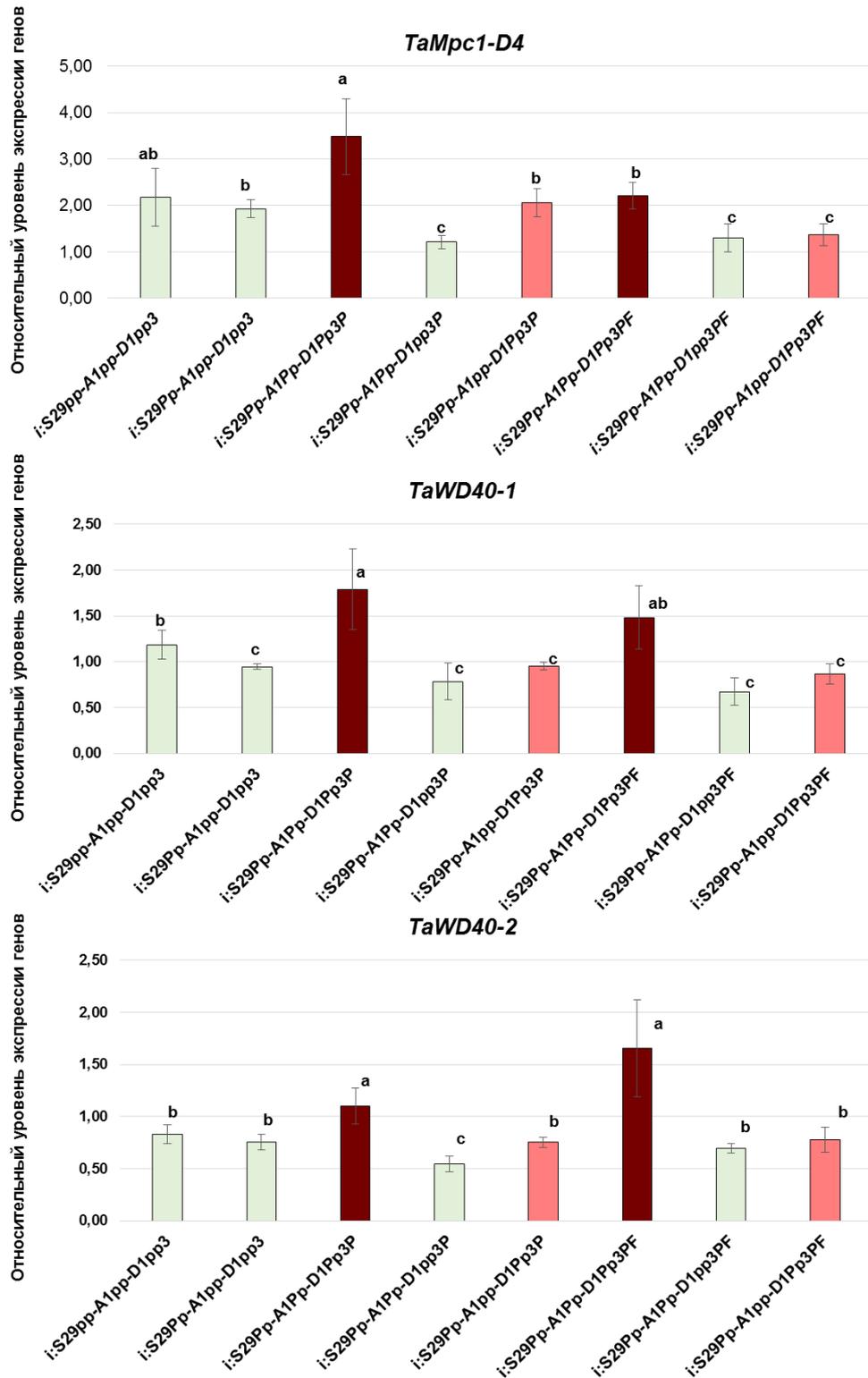


Рисунок 19. Относительный уровень мРНК генов *TaMpc1-D4*, *TaWD40-1* и *TaWD40-2* в перикарпе пшениц, имеющих различную окраску. Цвет колонки соответствует цвету перикарпа. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. *различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

3.2.2.3. Анализ экспрессии генов в динамике развития пшеницы

Поскольку количественная ПЦР на 5-й день после прорастания не выявила связи между относительным уровнем экспрессии генов *bHLH-Myc* и наличием антоцианов в колеоптиле, был проведён анализ, определяющий относительный уровень экспрессии данных генов в динамике развития колеоптиле пшеницы со 2-го по 5-й день после прорастания с использованием 3 генотипов: неокрашенный генотип Chinese Spring, светло-красный Саратовская 29 и темно-красный Chinese Spring (Норс7А) (Приложение 1).

Для всех проанализированных генов *Myc* второй гомеологической группы хромосом в каждом из трёх генотипов была обнаружена общая тенденция к снижению уровня мРНК с очень высокой на 2-й день до крайне низкой на 5-й день (Рисунок 20). Были обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии гена *TaMyc-B1* между сестринскими линиями Chinese Spring и Chinese Spring (Норс7А) на ранних стадиях развития (Рисунок 20). Эти генотипы отличаются аллельным состоянием гена *TaMpc1-A1*, который считается *Myc*-кодирующим регулятором синтеза антоцианов в колеоптиле. Привнесение доминантного гена *TaMpc1-A1* в геном Chinese Spring вызывает увеличение экспрессии гена *TaMyc-B1* в 2 раза (Рисунок 20). Предполагается, что *TaMyc-B1* может быть основным со-регулятором *TaMpc1-A1* в контроле биосинтеза антоцианов в колеоптиле.

Кроме того, для генотипа Саратовская 29 было обнаружено, что экспрессия гена *TaMyc-A2* на 2-й день развития значительно выше, чем его экспрессия в Chinese Spring и Chinese Spring (Норс7А) (примерно в 2 раза выше). Это различие может быть причиной появления слабого антоцианового цвета Саратовской 29 (Приложение 1). Саратовская 29 является носителем другого аллеля *TaMpc1-A1*, отличающегося как от Chinese Spring, так и от Chinese Spring (Норс7А). Конкретное распознавание различных копий *TaMyc-*

I различными факторами R2R3-Myb может быть выдвинуто как гипотеза для будущей проверки.

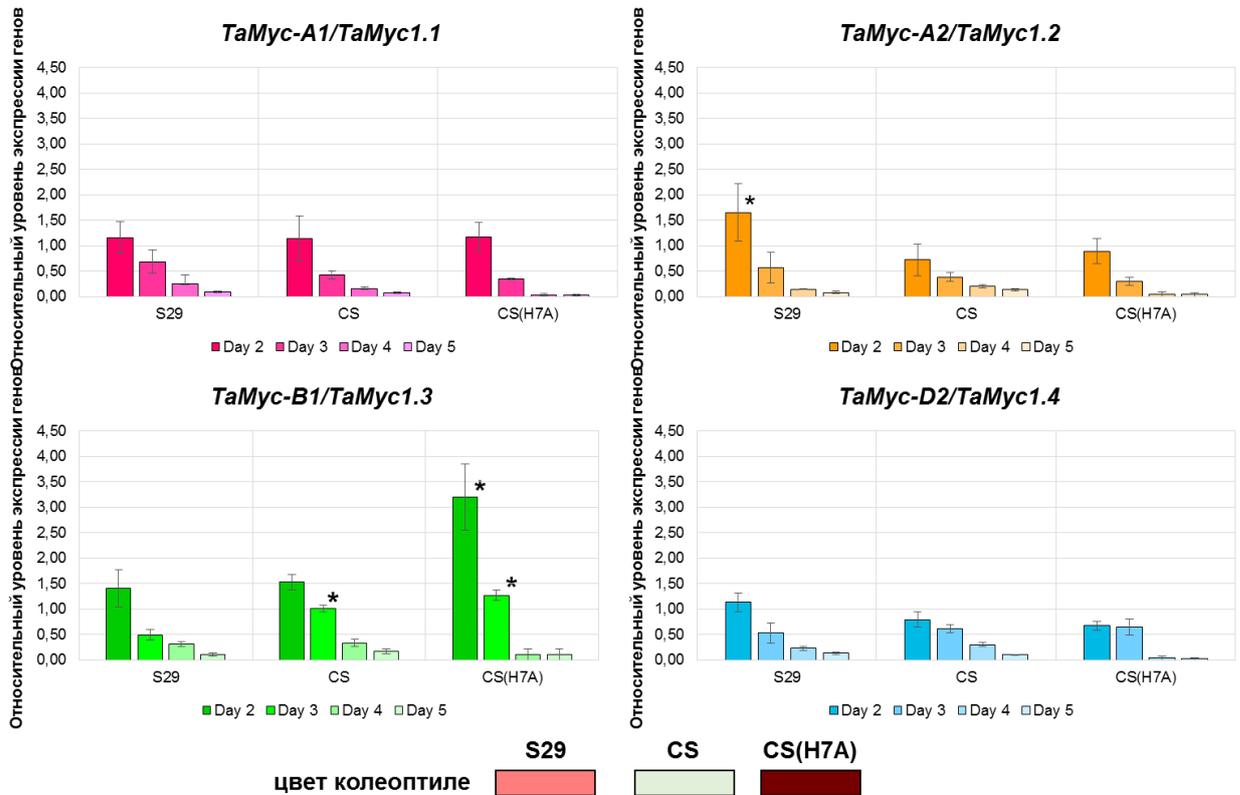


Рисунок 20. Относительный уровень мРНК генов *Мус* второй гомеологической группы хромосом в coleoptиле во время развития пшеницы (со 2-го по 5-й день). Планки погрешности отражают стандартную ошибку * различия статистически значимы между сотром Саратовская 29 (S29) и другими генотипами при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

Также в динамике развития была проверена экспрессия генов *Мус* четвёртой гомеологической группы хромосом – *TaMyc-2.1* и *TaMyc-2.5*. По этим генам была характерна схожая тенденция, как и генам *Мус* второй гомеологической группы хромосом – снижение экспрессии на 5 день развития (Рисунок 21), однако какого-либо значимого изменения уровня экспрессии между генотипами, связанного с изменением окраски, выявлено не было.

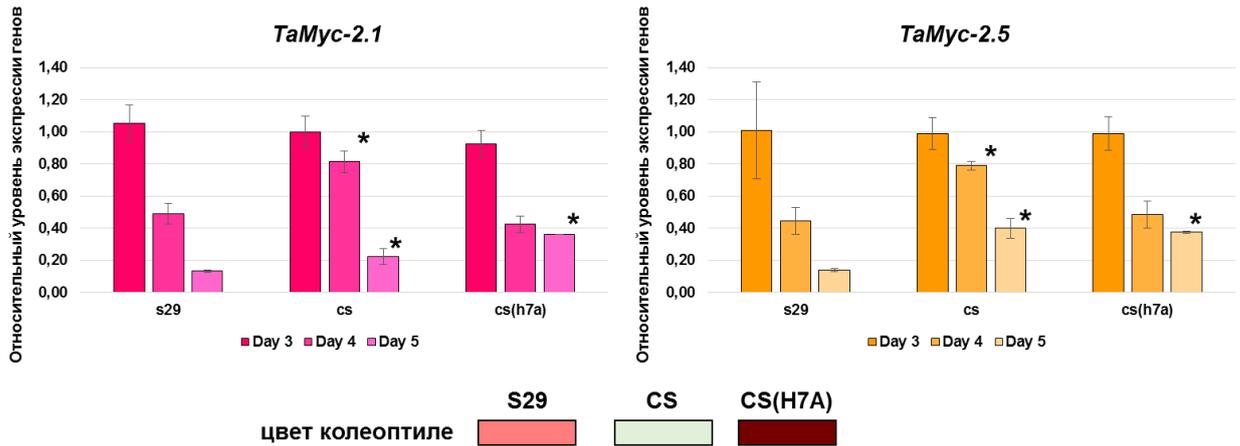


Рисунок 21. Относительный уровень мРНК генов *Мус* четвертой гомеологической группы хромосом в coleoptile во время развития пшеницы (с 3-го по 5-й день). Данные представлены как среднее значение. Планки погрешности отражают стандартную ошибку.

3.2.2.4. Анализ экспрессии генов в ответ на стресс

Обнаружение стресс-зависимых элементов в промоторах идентифицированных генов стало причиной анализа их уровней экспрессии в ответ на два вида стресса: засуха и солевой стресс. Относительные уровни мРНК генов измеряли в coleoptile растений Саратовская 29 в ответ на обработку 10% ПЭГ или 0,2М NaCl и сравнивали с таковым у растений, прораставших в дистиллированной воде.

Уровень мРНК генов *Мус* второй гомеологической группы хромосом значительно увеличился в проростках пшеницы, подверженных воздействию 10% ПЭГ (Рисунок 22). Солевой стресс индуцировал экспрессию только генов *TaMyc-B1* и *TaMyc-A2*. Уровень мРНК *TaMyc-A1* снижался, а *TaMyc-D2* значимо не изменялся в ответ на обработку 0,2 М раствором NaCl. Изменения уровней мРНК были сопоставимы с изменениями содержания антоцианов в coleoptile, за исключением *TaMyc-A1* (Рисунок 22, Приложение 17).

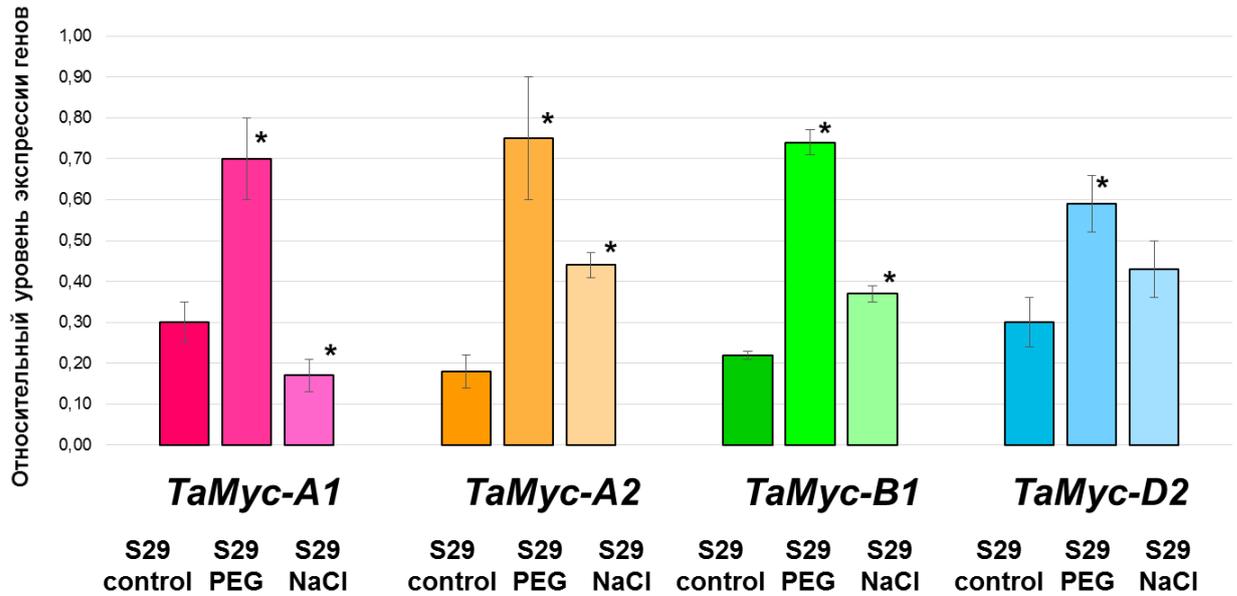


Рисунок 22. Относительный уровень мРНК *Мус*-подобных генов второй гомеологической группы хромосом в coleoptile пшеницы при солевом стрессе и засухе (на 4-й день после прорастания). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. * различия статистически значимы между стрессом и контролем при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

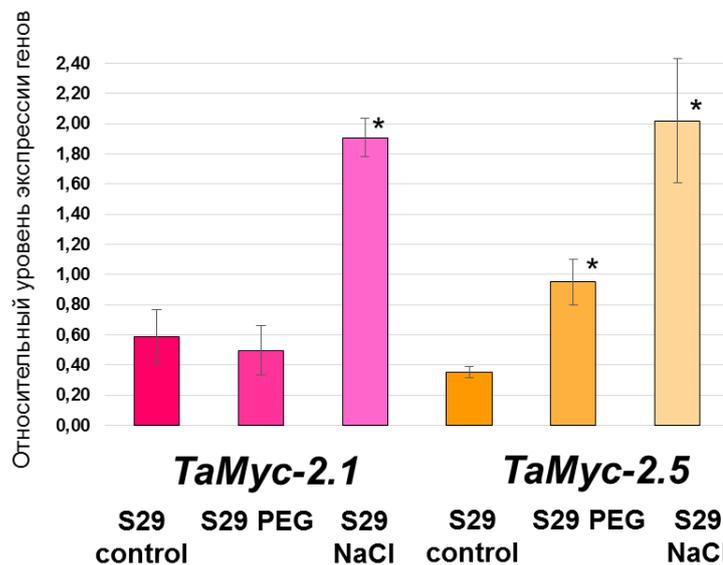


Рисунок 23. Относительный уровень мРНК *МУС*-подобных генов четвертой гомеологической группы хромосом в coleoptile пшеницы при солевом стрессе и засухе (на 4-й день после прорастания). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. * различия статистически значимы между стрессом и контролем при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

Совершенно другой паттерн экспрессии наблюдался при анализе генов *Myc* четвертой гомеологической группы хромосом: экспрессия данных генов увеличивалась в ответ на стресс (сильнее – на обработку 0,2 М раствором NaCl), но это увеличение не соотносится с содержанием антоцианов в анализируемой ткани (Рисунок 23). Кроме того, экспрессия *TaMyc-2.1* не изменилась в ответ на обработку 10% раствором ПЭГ.

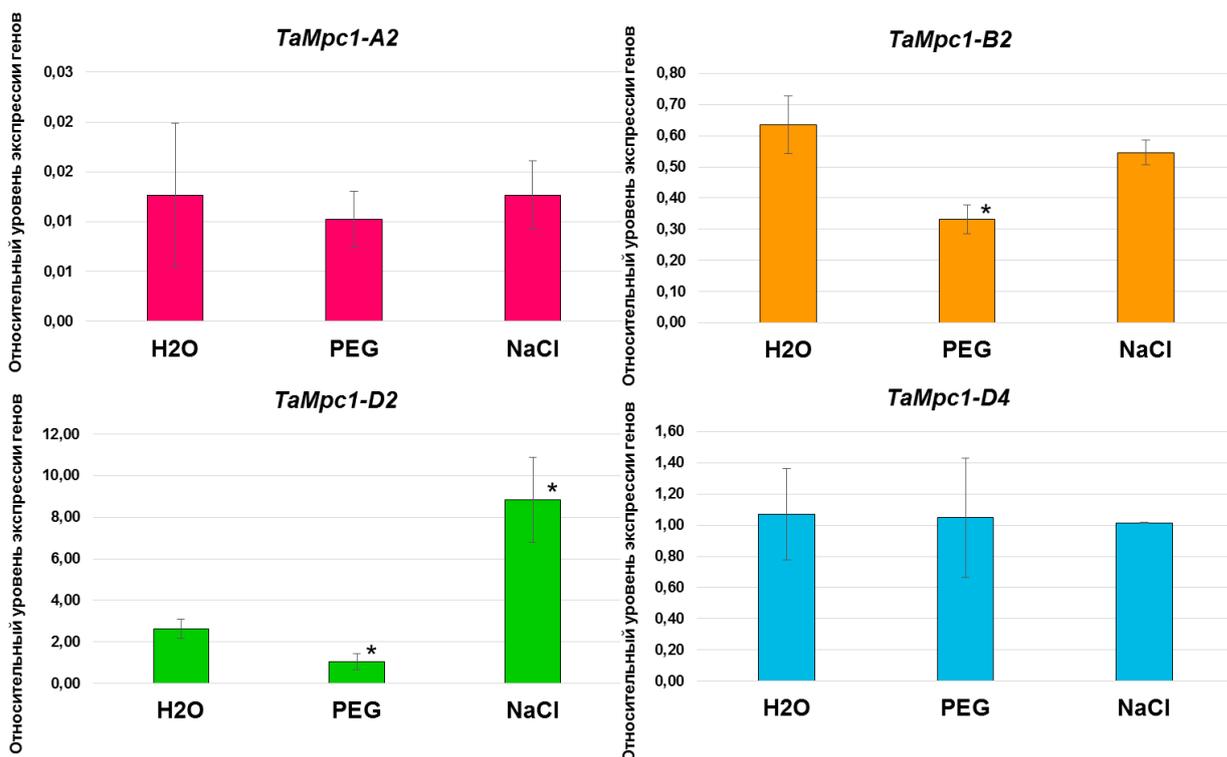


Рисунок 24. Относительный уровень мРНК генов *Myc* четвертой гомеологической группы хромосом в coleoptile пшеницы при солевом стрессе и засухе (на 4-й день после прорастания). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. * различия статистически значимы между стрессом и контролем при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

Изменение уровня экспрессии генов также было отмечено для генов *Myc* четвертой гомеологической группы хромосом, а именно для *TaMyc1-B2* и *TaMyc1-D2* (Рисунок 24). Несмотря на то, что связи между интенсивностью окраски coleoptile и активностью генов не наблюдалось, экспрессия данных

генов снижалась в ответ на обработку ПЭГ, а при солевом стрессе было отмечено увеличение уровня экспрессии гена *TaMpc1-D2* в 3,4 раза по сравнению с контролем.

Также был проанализирован относительный уровень экспрессии генов *WD40*. Для данных групп генов была отмечена общая тенденция к снижению уровня мРНК в проростках пшеницы, подверженных воздействию 10% ПЭГ (Рисунок 25).

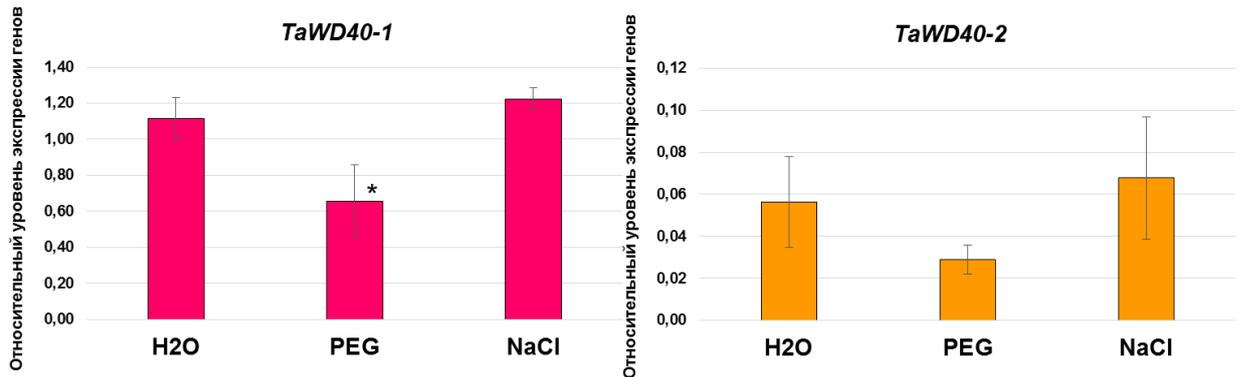


Рисунок 25. Относительный уровень мРНК генов *WD40* в coleoptile пшеницы при солевом стрессе и засухе (на 4-й день после прорастания). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. * различия статистически значимы между стрессом и контролем при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

3.3. Молекулярное картирование генов *HvMyc2* и *HvMpc1-H2* ячменя

Для молекулярного картирования была выбрана популяция удвоенных гаплоидных линий OWB (Oregon Wolfe Barley). С помощью разработанного CAPS-маркера к гену *HvMyc2* было установлено, что сорок четыре линии из девяносто двух несли доминантный аллель *HvMyc2* как у линии ВА (Приложение 1). Коэффициент сегрегации соответствовал ожидаемому 1:1 ($\chi^2 = 0,17$; $p > 0,50$). В работе были использованы данные генотипирования *HvMyc2* вместе с доступными данными SSR- и RFLP-локусов (simple sequence repeat; restriction fragment length polymorphism) для анализа сцепления. Ген *HvMyc2* оказался тесно сцеплен с локусом SSR XBmac186-4H (Рисунок 26).

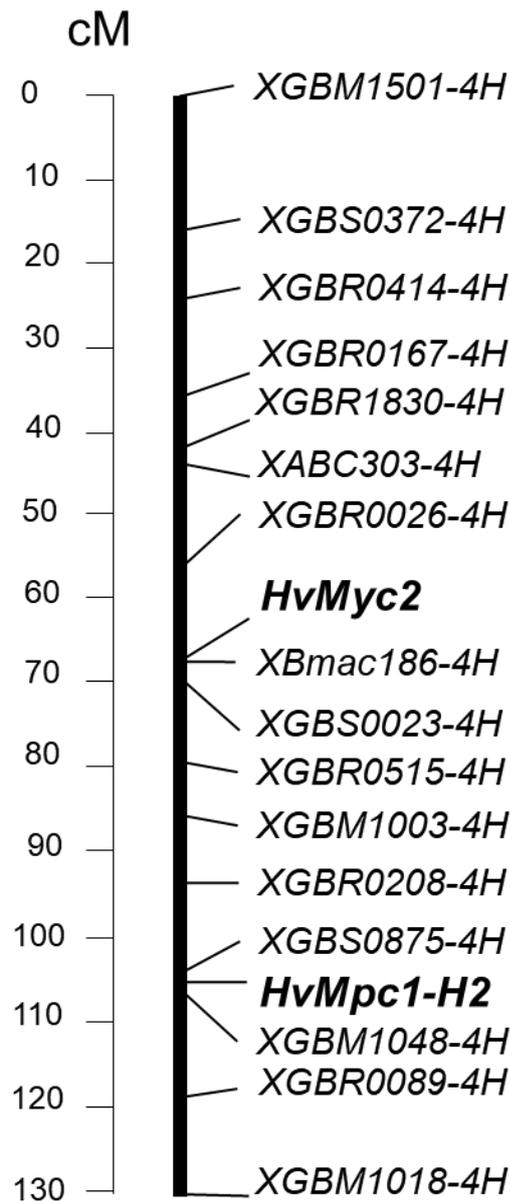


Рисунок 26. Молекулярно-генетическое картирование генов *HvMyc2* и *HvMpc1-H2* на хромосоме 4H ячменя

Аналогично, для картирования *HvMpc1-H2* были разработаны CAPS-маркеры (основанные на однонуклеотидных полиморфизмах между OWB-Dom и OWB-Rec) (Рисунок 26). Коэффициент сегрегации для *HvMpc2* (44:48) соответствовал ожидаемому 1:1 ($\chi^2 = 0,17$; $p > 0,50$). *HvMpc2* оказался между локусами SSRS0875-4H (дистальнее на 3,4 сМ) и XGBM1048-4H (проксимальнее на 3,4 сМ).

Сравнение положения гена *HvMyc2* (а также структурного гена *HvF3'5'H-1* (*Blx4*), участвующего в биосинтезе голубых антоциановых пигментов в алейроновом слое ячменя (Strygina et al., 2017)) на хромосоме 4HL и сопоставление с кластером *Blx1 / Blx3 / Blx4* (Franczowskiak, 1997) привело к выводу об их колокализации. Сопоставление точного положения генов *HvMpc1-H3* (chr4H:533784301-533784970), *HvMyc2* (chr4H:534044159-534066299) и *HvF3'5'H-1* (chr4H:534190658-534192411) позволяет сделать вывод о том, что данные гены соответствуют локусам *Blx1*, *Blx3* и *Blx4*, соответственно.

3.4. Характеристика паттернов метилирования *цис*-регуляторных районов дублированных генов, вовлечённых в синтез флавоноидных соединений пшеницы

В настоящей работе была высказана гипотеза о том, что специфичность экспрессии отдельных копий генов биосинтеза флавоноидов может быть связана с различием паттернов метилирования одних и тех же копий в разных тканях. В данной работе удалось предсказать возможные сайты CpG-метилирования последовательностей (изображены красными штрихами на Рисунках 27-29), а также разработать ген-специфичные праймеры к промоторам каждого из анализируемых генов.

***TaF3H* и *TaCHI*.** Ранее показана функциональная дивергенция между некоторыми копиями структурных генов (*F3H* и *CHI*) биосинтеза флавоноидов пшеницы (Khlestkina et al., 2013; Shoeva et al., 2014a). Анализ паттернов метилирования *цис*-регуляторных областей регуляторного гена генов *TaF3H-B2* (специфично экспрессируется в корнях) и *TaF3H-B1* (не экспрессируется в корнях, но экспрессируется в других различных частях растения, включая coleoptile) на основе метода бисульфитного секвенирования не выявил различий при сравнении метилирования промотора одного и того же гена в корне и coleoptile (Рисунок 27).

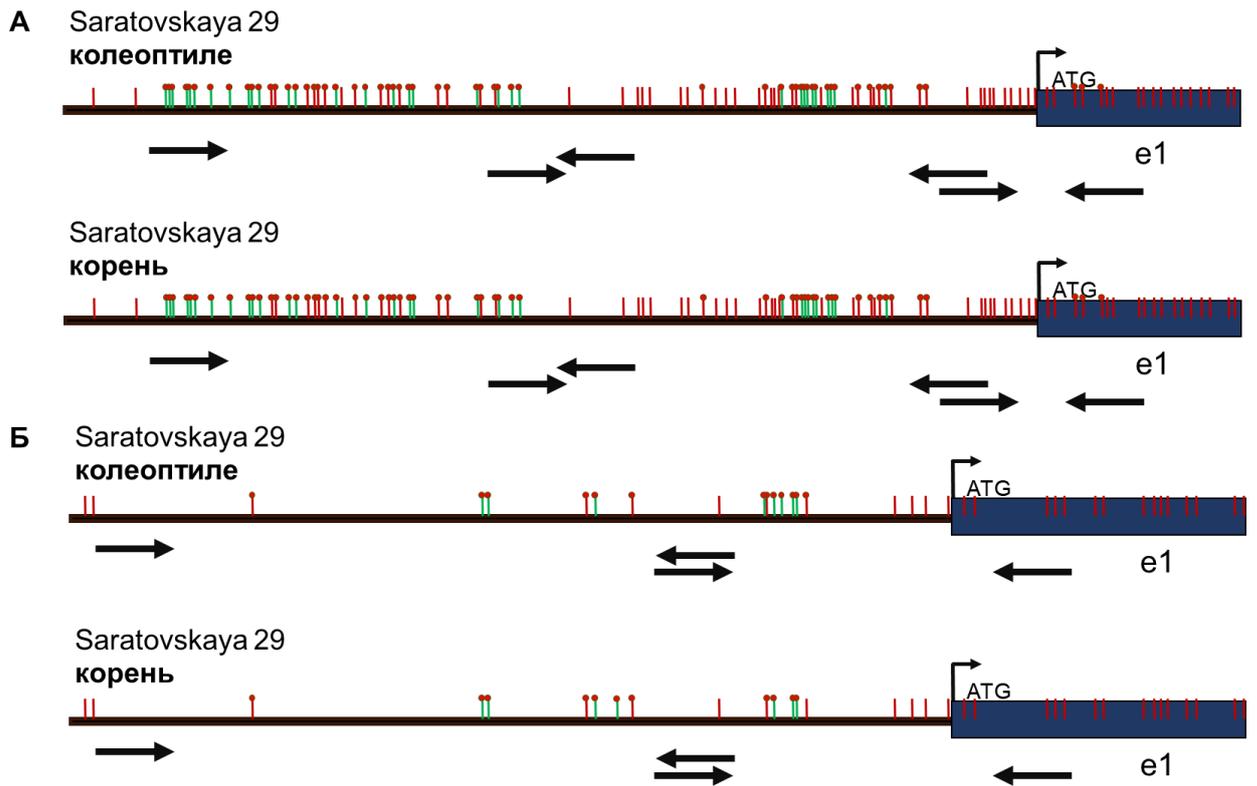


Рисунок 27. Паттерны метилирования промоторных областей гена (а) *TaF3H-B1* (737 п.н.) и (б) *TaF3H-B2* (598 п.н.) пшеницы в coleoptile и корне. Стрелки обозначают праймеры. Вертикальные красные штрихи – предсказанные сайты метилирования. Вертикальные зелёные штрихи – обнаруженные неканонические сайты метилирования. Красные круги – обнаруженные сайты метилирования.

Промоторы генов *TaCHI-A1* (сильно экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне), *TaCHI-B1* (слабо экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне) и *TaCHI-D1* (сильно экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне) вовсе оказались неметилированными как в корнях, так и в coleoptile (Рисунок 28).

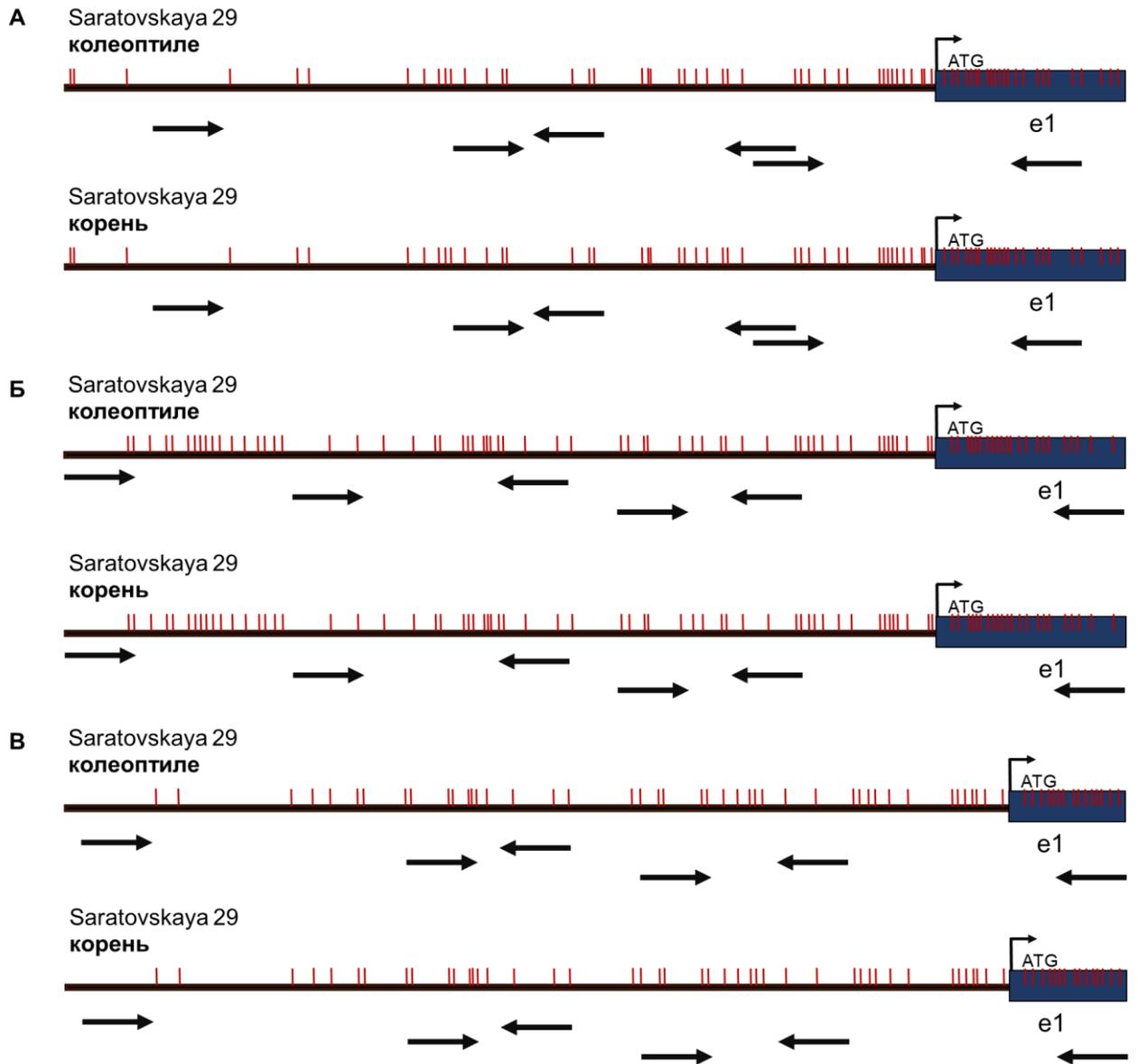


Рисунок 28. Паттерны метилирования промоторных областей гена (а) *TaCHI-A1* (799 п.н.), (б) *TaCHI-B1* (923 п.н.) и (в) *TaCHI-D1* (715 п.н.) пшеницы в coleoptile и корне. Стрелки обозначают праймеры. Вертикальные красные штрихи – предсказанные сайты метилирования. Вертикальные зелёные штрихи – обнаруженные неканоничные сайты метилирования. Красные круги – обнаруженные сайты метилирования.

***TaMyc-A1*.** Также был охарактеризован паттерн метилирования промотора регуляторного гена *TaMyc-A1*, отвечающего за отличия на уровне фенотипа по признаку антоциановая окраска перикарпа (Shoeva et al., 2014b). В связи с этим проверялась гипотеза о возможной роли паттернов

метилирования промоторов данного гена у генотипов, отличающихся контрастным фенотипом: почти изогенные линии пшеницы Саратовская 29 и *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*. Однако высказанная гипотеза не подтвердилась – промотор *TaMyc-A1* у обоих генотипов оказался неметилированным (Рисунок 29).

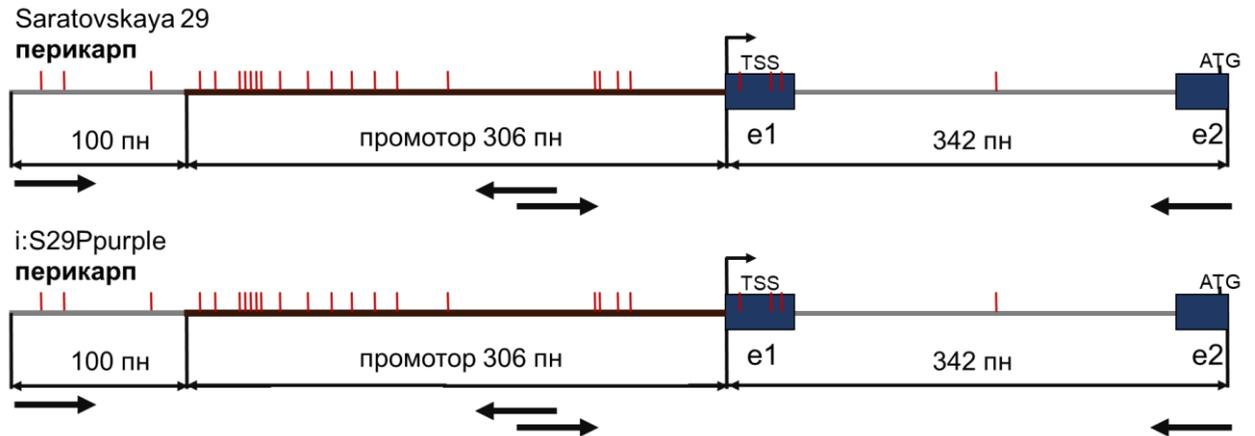


Рисунок 29. Паттерны метилирования промоторных областей гена *TaMyc-A1* (748 п.н) пшеницы в перикарпах. Стрелки обозначают праймеры. Вертикальные красные штрихи – предсказанные сайты метилирования. Вертикальные зелёные штрихи – обнаруженные неканоничные сайты метилирования. Красные круги – обнаруженные сайты метилирования.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Эволюция генов MBW-комплекса трибы Triticeae

4.1.1. Гены *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*

На сегодняшний день гены, кодирующие факторы транскрипции R2R3-Myb, связанные с биосинтезом флавоноидных пигментов антоцианов, известны и локализованы в седьмой гомеологической группе хромосом: *TaMpc1-1 / TaC1* в хромосомах пшеницы 7A, 7B и 7D и *HvMpc1-H1 / HvAnt1* в хромосоме ячменя 7H (Himi E. et al., 2015). Однако данные, полученные ранее при Саузерн-блот-анализе нулли-тетрасомных линий пшеницы (Li et al., 1999) показали наличие гомологов генов *Mpc1* в хромосомах четвертой гомеологической группы. При использовании последовательностей генов *Mpc1-1*, были идентифицированы 5 дополнительных копий генов в 5A, 4B и 4D хромосомах мягкой пшеницы и 2 дополнительных копии в хромосоме 4H ячменя. Было продемонстрировано, что эти гены делятся на три основных кластера, причем группа *Mpc1-3* является наименьшей (Рисунок 11). Вероятно, гены *Mpc1-3* были сильнее всего подвержены псевдогенизации и элиминации из геномов растений трибы Triticeae. Данная гипотеза подтверждается тем, что соотношение Ka / Ks для генов данной группы было самым большим в сравнении с генами *Mpc1-1* (в среднем 0,664) и *Mpc1-2* (в среднем 0,688): $Ka / Ks_{HvMpc1-H3} = 0,820$; $Ka / Ks_{TaMpc1-D3} = 0,717$; $Ka / Ks_{AeshMpc1-B3} = 0,870$; $Ka / Ks_{AetMpc1-D3} = 0,782$ (Приложение 4). Таким образом, эти гены в меньшей степени подвергнуты стабилизирующему отбору.

Также было установлено, что геномы трибы Triticeae сохранили большее число высокогомологичных копий генов *bHLH* типа *Myc*, чем генов *Myb* (Рисунки 11 и 12, Приложение 1). Сохранение такого большого числа копий могло бы указывать на их специализацию в синтезе различных классов

флавоноидов в разных тканях. Однако, как было установлено из анализа первичной структуры и паттернов экспрессии генов *Мус*, большинство данных генов подверлись псевдогенизации, причём в большей степени это коснулось генов четвертой гомеологической группы хромосом.

Данный факт интересным образом соотносится с эволюцией генов *Муб* четвёртой гомеологической группы хромосом. Во-первых, скорость накопления несинонимичных нуклеотидных замен генами *Мус* четвертой гомеологической группы хромосом ($Ka / Ks_{Myc-2} = 0,814$) в среднем выше, чем *Мус* второй гомеологической группы ($Ka / Ks_{Myc-1} = 0,768$). Во-вторых, два основных события дупликации генов в данных группах произошли примерно в одни временные интервалы и с участием четвёртой хромосомы общего предка Triticeae. Первое событие случилось 18,8 и 19,2 млн лет назад между 4 и 7 хромосомами генов *Муб* и между 2 и 4 хромосомами генов *Мус*, соответственно. Второе событие – дупликация генов *Муб* и *Мус* внутри 4 хромосомы 15,2 и 16,3 млн лет назад (Рисунки 11 и 12). При этом, как было установлено, у ячменя *Муб*-кодирующий ген *HvMpc1-H3* и *Мус*-кодирующий ген *HvMuc2* располагаются в близких участках хромосомы – chr4H:533784301-533784970 и chr4H:534044159-534066299, соответственно. Вероятно, изначально последовательности генов *Муб* и *Мус* локализовались в хромосомах 2 и 7 общего предка Triticeae, а образование паралогичных копий в 4 хромосоме несло вторичный характер.

Гены *Муб* и *Мус* четвёртой хромосомы у представителей Triticeae участвуют в одном пути вторичного метаболизма – биосинтез антоцианов в алейроновом слое зерновки (Strygina et al., 2017; Li et al., 2017). Вместе с геном *HvF3'5'H-1* данные последовательности образуют группу близко расположенных генов *Blx1 / Blx3 / Blx4* (Franckowiak, 1997; Strygina et al., 2017) на хромосоме 4HL. Кластеризация негомологичных функционально родственных генов вторичного метаболизма в геномах растений, подобно оперонной системе бактерий, не является исключительным событием (Osbourn, 2010). У растений к настоящему времени зарегистрировано около 20

и предсказано более сотни специализированных метаболических путей, расположенных в виде генных кластеров, и в большинстве случаев это гены биосинтеза терпенов, алкалоидов и фенилпропаноидов (Boycheva et al., 2014; Chae et al., 2014; Nützmänn et al., 2014, 2016; Schlapfer et al., 2017). В целом, кластеры генов этого типа, по-видимому, необходимы для роста или выживания в определенных условиях окружающей среды и поэтому могут рассматриваться как адаптивные механизмы.

4.1.2. Гены *WD40*

Белки семейства *WD40* являются немногочисленным классом факторов транскрипции. Данные ТФ вовлечены в регуляцию многих процессов в клетке, таких как клеточная дифференцировка, реакция на биотические и абиотические стрессы, образование корневых волосков и трихом, а также синтез фенольных соединений, включая флавоноиды (Feller et al., 2011).

У представителей трибы *Triticeae* долгое время не было информации о локализации и первичной структуре *WD40*-кодирующих генов, способных регулировать синтез флавоноидов. В данной работе были идентифицированы *WD40*-кодирующие гены, локализованные в хромосомах 6L и 6S (Рисунок 13). Несмотря на то, что дивергенция между данными копиями произошла намного раньше событий, описанных выше для генов *R2R3-Myb* и *bHLH* типа *Myc*, степень гомологии между полными кодирующими последовательностями копий *WD40-1* и *WD40-2* сопоставима с *Myb* и *Myc* и составляет около 60%. Поскольку данные белки регулируют столь разнообразные и важные клеточные процессы, то рабочее состояние генов, как и их первичная последовательность, поддерживается отбором.

4.2. Компоненты *MBW*-комплекса пшеницы как генетические факторы регуляции экспрессии генов биосинтеза флавоноидов

4.2.1. R2R3-Myb

Гены *Mrc1-1* являются специфическими регуляторами биосинтеза антоцианиновых пигментов (Шоева и др., 2018; Khlestkina et al., 2015). В данной работе была определена экспрессия ранее неисследованных генов *Mrc1-2*, *Mrc1-3* и *Mrc1-4*. Было показано, что почти все эти гены транскрипционно активны и характеризуются тканеспецифическим паттерном экспрессии. Тот факт, что ни один из генов *Mrc1* пшеницы не экспрессировался в корнях, указывает на то, что, вероятно, существуют другие R2R3-Myb-кодирующие гены в геноме *T. aestivum* с более низким уровнем гомологии, обеспечивающие биосинтез флавоноидов в корнях растения.

Интересный факт был отмечен для *TaMrc1-A2* – его экспрессия соотносится с окраской coleoptile пшеницы (Рисунок 16). Потенциально транскрипт именно этого гена, который специфично экспрессируется в окрашенном антоцианами coleoptile, ранее был обнаружен и клонирован в сорте пшеницы Iksan370 в работе Shin et al. (2016). Ни один из других генов *Mrc1-2*, *Mrc1-3* или *Mrc1-4* не продемонстрировал связи с пигментацией coleoptile. Однако известно, что цвет coleoptile (а также цвет перикарпа) обеспечивается наличием доминантных генов *Mrc1-1*, локализованных в 7-й гомологической группе хромосом (Himi E. et al., 2015; Jiang et al., 2018). *TaMrc1-A2* может участвовать в синтезе неокрашенных предшественников антоцианов в coleoptile пшеницы как совместный регулятор генов *Mrc1-1*. Ген *TaMrc1-D4*, экспрессия которого была зафиксирована на высоком уровне как в coleoptile, так и в перикарпе пшениц, с другой стороны, может быть другим регулятором биосинтеза неокрашенных флавоноидных соединений в этих органах (Рисунки 16 и 20).

Отсутствие вовлеченности данных генов в непосредственный синтез антоциановых пигментов подтвердилось анализом уровня экспрессии генов *Mrc1* в coleoptile пшениц, подверженных различным факторам стресса (Рисунок 25), поскольку гены *TaMrc1-A2* и *TaMrc1-D4* не

продемонстрировали какое-либо стресс-зависимое изменение активности. Единственным геном, экспрессия которого значимо увеличилась в ответ на обработку растения раствором NaCl, стал *TaMpc1-D2* (Рисунок 25). Пигментация – это лишь одна из многочисленных ролей флавоноидных веществ. Они также широко известны своими адаптационными свойствами, которые помогают растениям выжить в неблагоприятных условиях окружающей среды (Khlestkina, 2013). Тот факт, что активность данного гена не изменилась в ответ на имитацию засухи с помощью раствора ПЭГ может свидетельствовать о специфическом ответе гена на конкретный фактор стресса.

4.2.2. bHLH-Мус

Специфические особенности ранее были определены для гена *TaMус-A1*, который вместе с Муб-кодирующими *TaMpc1-1*-генами контролирует биосинтез антоцианов в перикарпе зерновки (Shoeva et al., 2014b; Jiang et al., 2018). В ходе данного исследования было обнаружено, что по крайней мере еще одна *Мус*-копия – *TaMус-B1* – может быть вовлечена в биосинтез антоцианов (Рисунок 21). Кроме того, было продемонстрировано, что ранняя стадия развития пшеницы (до 3-го дня после прорастания) может быть ключевым этапом для инициации биосинтеза антоцианов в колеоптиле (Рисунок 21). Вероятно, поэтому мы не обнаружили существенных различий в экспрессии генов *Мус* среди генотипов, отличающихся пигментацией колеоптиле на более поздней стадии (на 5-й день после прорастания, Рисунок 17).

Хотя вышеупомянутый ген *TaMус-B1* может представлять собой пример субфункционализации, ген *TaMус-D1* наравне с большинством генов *Мус* четвертой гомеологической группы хромосом подвергся псевдогенизации. В гене *TaMус-D1* обнаружена мутация сдвига рамки считывания (Приложение 7). Для генов *TaMус-2.2*, *TaMус-2.3*, *TaMус-2.4* и *TaMус-2.6* транскрипционная

активность не была замечена ни в одном из проведённых экспериментов и ни в одной из тканей.

Сравнительная оценка уровней мРНК генов подсемейства *Мус* в условиях стресса (засоления и засухи) предполагала их участие в ответе на стресс (Рисунки 23 и 24). Кроме того, была обнаружена параллель между количественным содержанием антоцианов в колеоптиле и относительным уровнем экспрессии генов *Мус* второй гомеологической группы хромосом. Исключением был ген *ТаМус-А1*, для которого было обнаружено значимое снижение уровня мРНК в ответ на обработку 0,2 М раствором NaCl (Рисунок 23). Гены *Мус* четвертой гомеологической группы хромосом продемонстрировали иной характер экспрессии: уровень мРНК почти или полностью не увеличился в ответ на обработку ПЭГ, однако увеличение уровня экспрессии данных генов произошло в ответ на обработку раствором NaCl (Рисунок 24).

Засуха и засоление вызывают такие негативные эффекты в клетке растения, как осмотический и окислительный стресс, репрессия фотосинтеза, повреждение клеточных компонентов и нарушение обмена веществ. Различные флавоноидные вещества участвуют в осморегуляции, защите фотосинтетического аппарата и плазматической мембраны, нейтрализации свободных радикалов, возникающие при окислительном стрессе (Khlestkina E., 2013). Гены подсемейства *Мус* могут участвовать в повышении толерантности пшеницы в условиях стресса из-за активации синтеза различных флавоноидных соединений, в том числе антоцианинов. Таким образом, гены *Мус* второй гомеологической группы хромосом являются потенциальными регуляторами биосинтеза окрашенных фенольных соединений антоцианов, в то время как гены четвертой группы хромосом наравне с *Муб*-кодирующим геном *ТаМрс1-D2*, вероятно, вовлечены в специфический синтез флавоноидных компонентов в ответ на солевой стресс.

4.2.3. WD40

Впервые идентифицированные в данной работе были WD40-кодирующие гены, оказались локализованными в хромосомах 6L и 6S гомеологических групп (Рисунок 13). Экспрессия данных генов поддерживается на высоком уровне в различных органах и тканях пшеницы, при этом связь между уровнем экспрессии и пигментацией анализируемой ткани было выявлено только в перикарпе пшениц, обладающих насыщенной антоциановой окраской (Рисунок 20). Отсутствие связи между уровнем мРНК в колеоптиле пшениц и окраской ткани (как в нормальных условиях, так и в условиях стресса) может свидетельствовать о перикарп-специфической вовлеченности данных генов в синтез антоцианов.

4.3. Тканеспецифическая экспрессия компонентов MBW-комплекса ячменя

Поскольку пигментация стебля и перикарпа ячменя связана с доминантным геном *HvMrc1-H1* (Himi E. et al., 2015), то, вероятнее всего, экспрессия этого гена вызывает тканеспецифическое подавление генов *HvMrc1-H2* и *HvMrc1-H3* в перикарпе и подавление *HvMrc1-H3* в стеблях (Рисунок 15). Кроме этого, гены *HvMrc1-H1* и *HvMrc1-H2* могут являться регуляторами потенциального появления пигментации цветковой чешуи ячменя. Вполне вероятно, что повышенная экспрессия *HvMrc1-H1*, а также гена *HvMrc1-H2* в цветковых чешуях определяет тканеспецифическое подавление экспрессии *HvMrc1-H3* в данной ткани линии PLP (Рисунок 15). Отсутствие пигментации цветковых чешуй может быть обусловлено мутацией в другом регуляторном факторе – компоненте комплекса MBW (например, в *Mus*).

Оба гена *Mus* ячменя, локализованные во второй и четвертой хромосомах, вовлечены в тканеспецифический синтез антоциановых пигментов – ген

HvMyc1 в продукцию фиолетовых антоцианов в перикарпе (Cockram et al., 2010), а ген *HvMyc2*, как было обнаружено в настоящем исследовании, в биосинтез голубых пигментов в алейроновом слое (Рисунок 15).

При этом было отмечено, что ген *HvMyc2* экспрессируется не только в алейроновом слое, но и в цветковой чешуе ячменя. Среди идентифицированных генов *Mub* ячменя, повышенный уровень активности в данной ткани наблюдался для генов *HvMrc1-H1* и *HvMrc1-H2* (Рисунок 15). Возможно, *HvMrc1-H1* или *HvMrc1-H2*, взаимодействуя с *HvMyc2*, приводят к активации генов биосинтеза антоцианов в цветковых чешуях. Однако в гене *HvMyc2* линии PLP имеется такая же однонуклеотидная мутация, как в образцах BW или OWB-Res, приводящая к отсутствию в полипептиде функционально значимого домена bHLH. Возможно, именно поэтому мы не наблюдаем появление фиолетового пигмента в цветковых чешуях данной линии.

Гены *HvWD40-1* и *HvWD40-2* экспрессируются на высоком уровне в цветных и неокрашенных тканях и не имеют аллельных различий среди разных генотипов. Гены WD40 других видов растений (например, картофеля) имеют несколько другой профиль экспрессии, который соотносится с интенсивностью цвета ткани (Rayuavula et al., 2013). Однако слабая тканевая специфичность была отмечена для *HvWD40-2* – данный ген проявил повышенную экспрессию в тканях зерновки ячменя (Рисунок 15). Предполагается, что *HvWD40-2* вместе с *HvMrc1-H3* и *HvMyc2* в алейроне и *HvMrc1-H1* и *HvMyc1* в перикарпе образует регуляторный комплекс MBW, который необходим для активации структурных генов биосинтеза антоцианов.

4.4. Гены *Vlx* – факторы регуляции биосинтеза флавоноидов в алейроновом слое ячменя

В отличие от ячменя, мягкая пшеница может иметь голубую окраску алейронового слоя только за счёт замены одной хромосомы четвертой

гомеологической группы на хромосомы родственных видов, способных продуцировать голубой пигмент в зерновке (Zeven, 1991). Известно, что у ячменя хромосома 4Н ответственна за контроль появления голубой окраски алейрона (Mullick et al., 1958; Finch et al., 1978) и несет ортологи генов *Va T. boeoticum* и *Agropyron*.

Результаты данной работы показывают, что ген *HvMyc2* является основным компонентом регуляторной сети, определяющей изменение цвета алейрона ячменя. Во-первых, данный ген обладает специфической экспрессией (Рисунок 15). Во-вторых, в данном гене была обнаружена мутация сдвига рамки считывания (Приложение 8) в образцах ячменя, имеющих неокрашенный алейрон. Кроме того, сравнение точного положения *HvMyc2* на хромосоме 4НL и сопоставления с кластером *Blx1 / Blx3 / Blx4* (O'Sullivan, 2007) приводит к выводу об их колокализации и делает *HvMyc2* основным кандидатом на роль гена *Blx3*.

Ген *HvMpc1-H3*, вероятно, является со-регулятором гена *HvMyc2* в алейроне ячменя (Рисунок 15), о чём свидетельствует тканеспецифическая экспрессия данного гена и точное положение данного гена в геноме. Кроме того, в промоторе *HvMpc1-H3* в генотипе OWB-Res (Приложение 12) имеется мутация – инсерция 17 п.н. Если этот ген является отсутствующим R2R3-Myb-компонентом комплекса MBW, инициирующим синтез антоцианов в алейроне, то эта мутация в *HvMpc1-H3* с идентифицированной мутацией в *HvMyc2* в генотипе OWB-Res может быть причиной дигенного наследования при голубом окрашивании алейронового слоя в популяции OWB. Потенциально *HvMpc1-H3* является геном *Blx1* хромосомы 4НL.

Как было указано выше, последовательности *HvMpc1-H3* и *HvMyc2* вместе с геном *HvF3'5'H-1* на хромосоме 4НL образуют группу *Blx1 / Blx3 / Blx4* (Franckowiak, 1997; Strygina et al., 2017). Таким образом, в данной работе были выявлены все гены-кандидаты хромосомы 4НL для признака «голубая окраска зерна» у ячменя.

4.5. Роль паттернов метилирования ДНК *цис*-регуляторных районов дублированных генов, вовлечённых в синтез фенольных соединений

Нормализация дозы гена происходит благодаря генетическим и эпигенетическим изменениям. Например, среди трех гомеологичных копий гена *WLHS-1* пшеницы один ген потерял функциональность из-за мутации в функциональном домене, в то время как другая копия не транскрибируется из-за гиперметилирования, и только третий ген сохранил свою функциональность (Shitsukawa et al., 2007).

Такой эпигенетический фактор, как метилирование ДНК, имеет важное значение для связывания ТФ с *цис*-регуляторной областью гена. Однако в данной работе было выявлено, что в специфичном характере регуляции экспрессии изученных структурных и регуляторного генов биосинтеза фенольных соединений флавоноидов, по всей видимости, играют роль не характер метилирования ДНК анализируемой области, а специфичность экспрессии регуляторных факторов и структура промоторов копий генов.

В частности, доминантный (транскрибируется в перикарпе) и рецессивный (нет экспрессии) аллели гена *TaMyc-A1* идентичны по первичной структуре (Shoeva et al., 2014b). Недавно различие между аллелями *TaMyc-A1* было обнаружено в изменении счет tandemно дубликацированного элемента длиной 260 п.н. в промоторе (Yang et al., 2017). Тандемная дубликация этого элемента приводит к активации экспрессии *TaMyc-A1* и появлению пигмента в перикарпе пшеницы. Причины изменения экспрессии проанализированных структурных генов остаются невыясненными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов включает в себя широкий спектр механизмов, используемых клеткой для изменения уровня экспрессии конкретных генов, и, как следствие, изменения количества продуктов данных генов. В настоящей работе проводились идентификация и структурный анализ генов, кодирующих факторы транскрипции bHLH-Мус, R2R3-Myb и WD40, потенциально вовлеченные в регуляцию генов системы биосинтеза флавоноидов у представителей родов *Hordeum*, *Triticum* и *Aegilops*, а также исследование паттернов метилирования регуляторных и структурных генов биосинтеза флавоноидов мягкой пшеницы. Полученные данные важны для понимания механизмов формирования особенностей регуляции синтеза данных соединений у аллополиплоидной пшеницы, и позволяют сделать вывод о ключевом влиянии различий в первичной структуре промоторов данных генов на характер их экспрессии.

Было установлено, что один среди идентифицированных Мус-подобных последовательностей во второй и четвертой гомеологических группах хромосом пшеницы может быть регулятором появления пигментации в колеоптиле пшеницы – *TaМус-В1*. Для генов *Myb* пшеницы, расположенных на хромосомах 5А, 4В и 4D, была предположена роль регуляторов синтеза флавоноидов в конкретных органах пшеницы (Shin et al., 2016). Кроме того, предполагается, что впервые идентифицированные WD40-кодирующие гены, необходимы для активации структурных генов биосинтеза антоцианов, в частности, в зерновке.

Ранее неизвестная последовательность гена *HvМус2* ячменя, точно картированная в настоящей работе на хромосоме 4НL (тесно сцеплен с маркером *XВтаc186-4Н*), может служить основным компонентом регуляторной сети, определяющей изменение цвета алейронового слоя ячменя. Ген *HvМрc1-Н3* ячменя, также локализованный в хромосоме 4НL, показал специфичный паттерн экспрессии, что делает продукт данного гена

потенциальной частью регуляторного комплекса MBW, контролирующего синтез антоцианов в алейроновом слое, поскольку экспрессия *HvMpc1-H3* соотносится с цветом алейрона. Предполагается, что *HvMpc1-H3* и *HvMyc2* – гены-кандидаты для *Blx1* или *Blx3*.

Таким образом, данная работа расширяет существующие представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе появления антоциановой окраски различных органов ячменя и пшеницы. При этом настоящая работа позволила наметить направления будущих исследований, подтверждающих роль идентифицированных генов в специфическом накоплении пигментов. В частности, точное молекулярно-генетическое картирование гена *HvMpc1-H3* поможет прояснить, является ли данный ген одним из факторов кластера *Blx*. Кроме этого, редактирование генов *TaMyc-B1*, *HvMyc2* и *HvMpc1-H3* сможет служить проверкой гипотезы о специфической регуляции накопления антоцианов в конкретных органах растений.

ВЫВОДЫ

1. С помощью *in silico* анализа геномов представителей трибы Triticeae были идентифицированы и аннотированы высоко гомологичные последовательности регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *bHLH-Myc* (2 копии для ячменя, 11 копий для пшеницы), *R2R3-Myb* (3 копии для ячменя, 8 копий для пшеницы) и *WD40* (2 копии для ячменя, 5 копии для пшеницы).

2. Было показано, что из генов биосинтеза флавоноидов, входящих в регуляторный комплекс MBW, у представителей трибы Triticeae гены *WD40* более консервативны в отличие от быстро эволюционирующих генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*.

3. Благодаря изучению структурной организации и транскрипционной активности генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*, было установлено, что их дублированные копии, несмотря на приобретение функциональных отличий, остаются значимыми для пути биосинтеза флавоноидов.

4. Было показано, что различия в аллельном состоянии гена *HvMyc2* ячменя сопряжено с фенотипическими отличиями по признаку голубой окраски алейронового слоя, а его положение на генетической карте совпадает с локусом, контролирующим данный признак.

5. Сравнительный анализ экспрессии генов *bHLH-Myc* второй гомеологической группы хромосом в проростках различных линий пшеницы, контрастных по содержанию окрашенных флавоноидных пигментов, позволил предположить, что неизвестный до сих пор фактор *bHLH-Myc* комплекса MBW, активирующего синтез антоцианов в колеоптиле в оптимальных условиях, вероятно, кодируется геном *TaMyc-B1*. В стрессовых условиях в активации антоцианов наряду с *TaMyc-B1* могут потенциально участвовать и другие гомеологичные копии.

6. В результате анализа паттернов метилирования промоторов генов *TaMyc-A1*, *F3H* и *CNI* мягкой пшеницы было показано, что особенности метилирования данных областей не вносят существенного вклада в тканеспецифичный характер регуляции экспрессии изученных генов биосинтеза флавоноидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аджиева В. Ф. и др. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19. – №. 5. – С. 561-573.
2. Вавилов Н. И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости: Линевский вид как система. – Наука. Ленингр. отд-ние, 1967.
3. Шоева О. Ю., Стрыгина К. В., Хлесткина Е. К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – №. 3. – С. 333-342.
4. Aastrup S., Outtrup H., Erdal K. Location of the proanthocyanidins in the barley grain //Carlsberg Research Communications. – 1984. – Т. 49. – №. 1. – С. 105-109.
5. Abdel-Aal E. S. M., Young J. C., Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains //Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – Т. 54. – №. 13. – С. 4696-4704.
6. Aleshin A., Zhi D. Recombination-associated sequence homogenization of neighboring Alu elements: signature of nonallelic gene conversion //Molecular biology and evolution. – 2010. – Т. 27. – №. 10. – С. 2300-2311.
7. Allan A. C., Hellens R. P., Laing W. A. MYB transcription factors that colour our fruit //Trends in plant science. – 2008. – Т. 13. – №. 3. – С. 99-102.
8. Ayeleso T. B., Ramachela K., Mukwevho E. A review of therapeutic potentials of sweet potato: pharmacological activities and influence of the cultivar //Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2016. – Т. 15. – №. 12. – С. 2751-2761.
9. Babu M. M. et al. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks //Current opinion in structural biology. – 2004. – Т. 14. – №. 3. – С. 283-291.

10. Babu M. M., Teichmann S. A. Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli* //Nucleic acids research. – 2003. – T. 31. – №. 4. – C. 1234-1244.
11. Bailey J. A. et al. Recent segmental duplications in the human genome //Science. – 2002. – T. 297. – №. 5583. – C. 1003-1007.
12. Bailey J. A., Eichler E. E. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease //Nature Reviews Genetics. – 2006. – T. 7. – №. 7. – C. 552.
13. Balasundram N., Sundram K., Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses //Food chemistry. – 2006. – T. 99. – №. 1. – C. 191-203.
14. Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences //Cell. – 1981. – T. 27. – №. 2. – C. 299-308.
15. Bastow R. et al. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation //Nature. – 2004. – T. 427. – №. 6970. – C. 164.
16. Baudry A. et al. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* //The Plant Journal. – 2004. – T. 39. – №. 3. – C. 366-380.
17. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory //Genes & development. – 2002. – T. 16. – №. 1. – C. 6-21.
18. Bird A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation //Nature. – 1986. – T. 321. – №. 6067. – C. 209-213.
19. Blanco A. et al. A genetic linkage map of durum wheat //Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – T. 97. – №. 5-6. – C. 721-728.
20. Borges Bubols G. et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids //Mini reviews in medicinal chemistry. – 2013. – T. 13. – №. 3. – C. 318-334.
21. Boycheva S. et al. The rise of operon-like gene clusters in plants //Trends in plant science. – 2014. – T. 19. – №. 7. – C. 447-459.

22. Bowers J. E. et al. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events //Nature. – 2003. – T. 422. – №. 6930. – C. 433-438.
23. Bowman G. D., Poirier M. G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics //Chemical reviews. – 2014. – T. 115. – №. 6. – C. 2274-2295.
24. Broun P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis //Current opinion in plant biology. – 2005. – T. 8. – №. 3. – C. 272-279.
25. Brown T. A. Mutation, repair and recombination. – 2002.
26. Butelli E. et al. Changes in anthocyanin production during domestication of Citrus //Plant Physiology. – 2017. – C. pp. 01701.2016.
27. Butler J. E. F., Kadonaga J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression //Genes & development. – 2002. – T. 16. – №. 20. – C. 2583-2592.
28. Carocho M., Ferreira I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives //Food and chemical toxicology. – 2013. – T. 51. – C. 15-25.
29. Carroll S. B. Evolution at two levels: on genes and form //PLoS Biol. – 2005. – T. 3. – №. 7. – C. e245.
30. Cech T. R., Steitz J. A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones //Cell. – 2014. – T. 157. – №. 1. – C. 77-94.
31. Chaw S. M. et al. Dating the monocot–dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes //Journal of molecular evolution. – 2004. – T. 58. – №. 4. – C. 424-441.
32. Chen M., Lv S., Meng Y. Epigenetic performers in plants //Development, growth & differentiation. – 2010. – T. 52. – №. 6. – C. 555-566.

33. Chen Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – T. 58. – C. 377-406.
34. Cheng J. et al. Diversification of genes encoding granule-bound starch synthase in monocots and dicots is marked by multiple genome-wide duplication events // *PLoS One.* – 2012. – T. 7. – №. 1. – C. e30088.
35. Chinnusamy V., Zhu J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // *Current opinion in plant biology.* – 2009. – T. 12. – №. 2. – C. 133-139.
36. Cockram J. et al. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2010. – T. 107. – №. 50. – C. 21611-21616.
37. Cokus S. J. et al. Shotgun bisulfite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning // *Nature.* – 2008. – T. 452. – №. 7184. – C. 215.
38. Conant G. C., Wolfe K. H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions // *Nature Reviews Genetics.* – 2008. – T. 9. – №. 12. – C. 938-950.
39. Cooper G. M. Regulation of transcription in eukaryotes // *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. – 2000.
40. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // *Nucleic acids research.* – 1988. – T. 16. – №. 22. – C. 10881-10890.
41. Costa J. M. et al. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2001. – T. 103. – №. 2-3. – C. 415-424.
42. Dame R. T. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin // *Molecular microbiology.* – 2005. – T. 56. – №. 4. – C. 858-870.
43. De Beer D. et al. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine // *South African Journal of Enology and Viticulture.* – 2017. – T. 23. – №. 2. – C. 48-61.

44. De Lucia F. et al. A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008.
45. Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K. M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis* //Plant physiology. – 2000. – T. 122. – №. 2. – C. 403-414.
46. Devos K. M. et al. Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination //Theoretical and Applied Genetics. – 1995. – T. 91. – №. 2. – C. 282-288.
47. Dewanto V. et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity //Journal of agricultural and food chemistry. – 2002. – T. 50. – №. 10. – C. 3010-3014.
48. Di Ferdinando M. et al. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses //Abiotic Stress Responses in Plants. – Springer New York, 2012. – C. 159-179.
49. Dobrovolskaya O. et al. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum*) L //Euphytica. – 2006. – T. 150. – №. 3. – C. 355-364.
50. Doyle J. J. et al. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants //Annual review of genetics. – 2008. – T. 42. – C. 443-461.
51. Dubcovsky J. et al. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L //Genetics. – 1996. – T. 143. – №. 2. – C. 983-999.
52. Dubos C. et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* //Trends in plant science. – 2010. – T. 15. – №. 10. – C. 573-581.
53. Dvorak J., McGuire P. E., Cassidy B. Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences //Genome. – 1988. – T. 30. – №. 5. – C. 680-689.

54. Emanuel B. S., Shaikh T. H. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease // *Nature Reviews Genetics*. – 2001. – T. 2. – №. 10. – C. 791.
55. Espley R. V. et al. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10 // *The Plant Journal*. – 2007. – T. 49. – №. 3. – C. 414-427.
56. Farrona S., Coupland G., Turck F. The impact of chromatin regulation on the floral transition // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2008. – T. 19. – №. 6. – C. 560-573.
57. Feldman M., Levy A. A. Origin and evolution of wheat and related Triticeae species // *Alien introgression in Wheat*. – Springer, Cham, 2015. – C. 21-76.
58. Feller A. et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors // *The Plant Journal*. – 2011. – T. 66. – №. 1. – C. 94-116.
59. Finch R. A., Simpson E. New colours and complementary colour genes in barley // *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung*. – 1978.
60. Finn R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations // *Nucleic acids research*. – 2016. – T. 45. – №. D1. – C. D190-D199.
61. Finnegan E. J. et al. DNA methylation in plants // *Annual review of plant biology*. – 1998. – T. 49. – №. 1. – C. 223-247.
62. Franckowiak J.D. et al. New and revised descriptions of barley genes // *Barley Genet. Newslett.* – 1997. – T. 26. – C. 22-516.
63. Gale M. D., Flavell R. B. The genetic control of anthocyanin biosynthesis by homoeologous chromosomes in wheat // *Genetics Research*. – 1971. – T. 18. – №. 2. – C. 237-244.
64. Gaut B. S. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses // *Genome research*. – 2001. – T. 11. – №. 1. – C. 55-66.

65. Gehring M., Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. – 2007. – T. 1769. – №. 5. – C. 276-286.
66. Gibcus J. H., Dekker J. The context of gene expression regulation //F1000 biology reports. – 2012. – T. 4.
67. Gill B. S., Kimber G. Giemsa C-banding and the evolution of wheat //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1974. – T. 71. – №. 10. – C. 4086-4090.
68. Gonzalez A. et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings //The Plant Journal. – 2008. – T. 53. – №. 5. – C. 814-827.
69. Gordeeva E. I., Shoeva O. Y., Khlestkina E. K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (Pp) alleles //Euphytica. – 2015. – T. 203. – №. 2. – C. 469-476.
70. Gornicki P. et al. The chloroplast view of the evolution of polyploid wheat //New Phytologist. – 2014. – T. 204. – №. 3. – C. 704-714.
71. Gould K., Davies K. M., Winefield C. (ed.). Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications. – Springer Science & Business Media, 2008.
72. Grativol C., Hemerly A. S., Ferreira P. C. G. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. – 2012. – T. 1819. – №. 2. – C. 176-185.
73. Grotewold E. (ed.). The science of flavonoids. – 2006.
74. Grotewold E. et al. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – T. 97. – №. 25. – C. 13579-13584.
75. Grotewold E. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective //Trends in plant science. – 2005. – T. 10. – №. 2. – C. 57-62.

76. Grove C. A. et al. A multiparameter network reveals extensive divergence between *C. elegans* bHLH transcription factors //Cell. – 2009. – T. 138. – №. 2. – C. 314-327.
77. Gu X., Zhang Z., Huang W. Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – T. 102. – №. 3. – C. 707-712.
78. Gu Z. et al. Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species //Nature genetics. – 2004. – T. 36. – №. 6. – C. 577-579.
79. Gu Z. et al. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations //Nature. – 2003. – T. 421. – №. 6918. – C. 63.
80. Gurtan A. M., Sharp P. A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks //Journal of molecular biology. – 2013. – T. 425. – №. 19. – C. 3582-3600.
81. Hansen M. T. Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans* //Journal of bacteriology. – 1978. – T. 134. – №. 1. – C. 71-75.
82. Harlan H. V. Some distinctions in our cultivated barleys with reference to their use in plant breeding. – US Dept. of Agriculture, 1914. – №. 137.
83. Hauser M. T. et al. Transgenerational epigenetic inheritance in plants //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. – 2011. – T. 1809. – №. 8. – C. 459-468.
84. Henikoff S., Shilatifard A. Histone modification: cause or cog? //Trends in Genetics. – 2011. – T. 27. – №. 10. – C. 389-396.
85. Henry I. M. et al. Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response //Genetics. – 2005. – T. 170. – №. 4. – C. 1979-1988.
86. Hichri I. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine //Molecular plant. – 2010. – T. 3. – №. 3. – C. 509-523.

87. Higo K. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 //Nucleic acids research. – 1999. – T. 27. – №. 1. – C. 297-300.
88. Hilu K. W. Polyploidy and the evolution of domesticated plants //American Journal of Botany. – 1993. – C. 1494-1499.
89. Himi E. et al. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat //Theoretical and applied genetics. – 2011. – T. 122. – №. 8. – C. 1561-1576.
90. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat //Genome. – 2005. – T. 48. – №. 4. – C. 747-754.
91. Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol- 4- reductase (DFR) genes of wheat and their tissue- dependent expression //Journal of experimental botany. – 2004. – T. 55. – №. 396. – C. 365-375.
92. Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley Ant1 and wheat Rc genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues //Molecular genetics and genomics. – 2015. – T. 290. – №. 4. – C. 1287-1298.
93. Hsia C. C., McGinnis W. Evolution of transcription factor function //Current opinion in genetics & development. – 2003. – T. 13. – №. 2. – C. 199-206.
94. Inagaki S. et al. Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome //The EMBO journal. – 2010. – T. 29. – №. 20. – C. 3496-3506.
95. Jarillo J. A. et al. Chromatin remodeling in plant development //International Journal of Developmental Biology. – 2009. – T. 53. – №. 8-9-10. – C. 1581-1596.
96. Jende-Strid B., Lundqvist U. Diallelic tests of anthocyanin-deficient mutants //Barley Genet Newsl. – 1978. – T. 8. – C. 57-59.
97. Jha K. K. The association of a gene for purple coleoptile with chromosome 7D of common wheat //Canadian Journal of Genetics and Cytology. – 1964. – T. 6. – №. 3. – C. 370-372.

98. Jia Q. et al. Genetic mapping and molecular marker development for the gene *Pre2* controlling purple grains in barley // *Euphytica*. – 2016. – T. 208. – №. 2. – C. 215-223.
99. Jiang W. et al. Prevalent role of gene features in determining evolutionary fates of whole-genome duplication duplicated genes in flowering plants // *Plant physiology*. – 2013. – T. 161. – №. 4. – C. 1844-1861.
100. Jiang W. et al. Two transcription factors *TaPpm1* and *TaPpb1* co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat // *Journal of experimental botany*. – 2018. – T. 69. – №. 10. – C. 2555-2567.
101. Johnson L. M. et al. The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation // *Current Biology*. – 2007. – T. 17. – №. 4. – C. 379-384.
102. Juven-Gershon T. et al. The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription // *Current opinion in cell biology*. – 2008. – T. 20. – №. 3. – C. 253-259.
103. Kejnovsky E., Leitch I. J., Leitch A. R. Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2009. – T. 24. – №. 10. – C. 572-582.
104. Khlestkina E. et al. Variability of *Rc* (red coleoptile) alleles in wheat and wheat-alien genetic stock collections // *Cereal research communications*. – 2011. – T. 39. – №. 4. – C. 465-474.
105. Khlestkina E. K. Current applications of wheat and wheat–alien precise genetic stocks // *Molecular breeding*. – 2014. – T. 34. – №. 2. – C. 273-281.
106. Khlestkina E. K. et al. Diversification of the duplicated *F3h* genes in *Triticeae* // *Journal of molecular evolution*. – 2013. – T. 76. – №. 4. – C. 261-266.
107. Khlestkina E. K. Genes determining the coloration of different organs in wheat // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 54-65.
108. Khlestkina E. K., Gordeeva E. I., Arbusova V. S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line ‘i: S29Ra’ having intensive

anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles //Plant Breeding. – 2014. – T. 133. – №. 4. – C. 454-458.

109. Khlestkina E. K., Röder M. S., Salina E. A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome—a case study in bread wheat //BMC Plant Biology. – 2008. – T. 8. – №. 1. – C. 1.

110. Khlestkina E. K., Shoeva O. Y., Gordeeva E. I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat //Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – T. 5. – №. 3. – C. 268-278.

111. Khlestkina E. K., Tereshchenko O. Y., Salina E. A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat–rye hybrids //Molecular genetics and genomics. – 2009. – T. 282. – №. 5. – C. 475-485.

112. Khlestkina E. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals //Cereal research communications. – 2013. – T. 41. – №. 2. – C. 185-198.

113. King I. P. et al. Detection of interchromosomal translocations within the Triticeae by RFLP analysis //Genome. – 1994. – T. 37. – №. 5. – C. 882-887.

114. Klempnauer K. H., Gonda T. J., Bishop J. M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-Myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene //Cell. – 1982. – T. 31. – №. 2. – C. 453-463.

115. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color //Science. – 2004. – T. 304. – №. 5673. – C. 982-982.

116. Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species //Food and bioproducts processing. – 2011. – T. 89. – №. 3. – C. 217-233.

117. Lachman J. et al. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain—A review //Journal of Cereal Science. – 2017. – T. 74. – C. 145-154.

118. Landi M., Tattini M., Gould K. S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions //Environmental and Experimental Botany. – 2015. – T. 119. – C. 4-17.

119. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell*. – 1993. – T. 75. – №. 5. – C. 843-854.
120. Levasseur A., Pontarotti P. The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary-based approaches in comparative genomics // *Biology direct*. – 2011. – T. 6. – №. 1. – C. 11.
121. Lev-Yadun S., Gould K. S. Role of anthocyanins in plant defence // *Anthocyanins*. – Springer New York, 2008. – C. 22-28.
122. Li D. et al. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2017. – T. 57. – №. 8. – C. 1729-1741.
123. Li N. et al. ThMYC4E, candidate Blue aleurone 1 gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum* // *PloS one*. – 2017. – T. 12. – №. 7. – C. e0181116.
124. Li S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex // *Plant signaling & behavior*. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. e27522.
125. Li W. et al. Recurrence of chromosome rearrangements and reuse of DNA breakpoints in the evolution of the Triticeae genomes // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2016. – C. g3. 116.035089.
126. Li W. L. et al. Genomic mapping of defense response genes in wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999. – T. 98. – №. 2. – C. 226-233.
127. Li W., Notani D., Rosenfeld M. G. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives // *Nature Reviews Genetics*. – 2016. – T. 17. – №. 4. – C. 207.
128. Lindemose S. et al. Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – T. 14. – №. 3. – C. 5842-5878.
129. Lipsick J. S. One billion years of Myb // *Oncogene*. – 1996. – T. 13. – №. 2. – C. 223-235.

130. Liu C. et al. Histone methylation in higher plants //Annual review of plant biology. – 2010. – T. 61. – C. 395-420.
131. Lundqvist U., Franckowiak J. D. Diversity of barley mutants //Diversity in barley. – 2003. – C. 77-96.
132. Lynch M., Conery J. S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes //Science. – 2000a. – T. 290. – №. 5494. – C. 1151-1155.
133. Lynch M., Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization //Genetics. – 2000b. – T. 154. – №. 1. – C. 459-473.
134. Lynch V. J., May G., Wagner G. P. Regulatory evolution through divergence of a phosphoswitch in the transcription factor CEBPB //Nature. – 2011. – T. 480. – №. 7377. – C. 383-386.
135. Marcussen T. et al. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat //Science. – 2014. – T. 345. – №. 6194. – C. 1250092.
136. Martin C., Paz-Ares J. MYB transcription factors in plants //Trends in Genetics. – 1997. – T. 13. – №. 2. – C. 67-73.
137. Masterson J. et al. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms //Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information. – 1994. – T. 264. – №. 5157. – C. 421-423.
138. Maston G. A., Evans S. K., Green M. R. Transcriptional regulatory elements in the human genome //Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2006. – T. 7. – C. 29-59.
139. Matthews D. E. et al. GrainGenes, the genome database for small-grain crops //Nucleic acids research. – 2003. – T. 31. – №. 1. – C. 183-186.
140. Mehrtens F. et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis //Plant Physiology. – 2005. – T. 138. – №. 2. – C. 1083-1096.
141. Mehta A., Haber J. E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2014. – C. a016428.

142. Mjelle R. Multiple layers of gene regulation: the cell cycle, epigenetics and microRNAs. – 2015.
143. Moreau P. et al. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants //Nucleic acids research. – 1981. – T. 9. – №. 22. – C. 6047-6068.
144. Muller H. J. Why polyploidy is rarer in animals than in plants //The American Naturalist. – 1925. – T. 59. – №. 663. – C. 346-353.
145. Mullick D. B. et al. Anthocyanins and anthocyanidins of the barley pericarp and aleurone tissues //Canadian Journal of Plant Science. – 1958. – T. 38. – №. 4. – C. 445-456.
146. Müntzing A. The evolutionary significance of autopolyploidy //Hereditas. – 1936. – T. 21. – №. 2- 3. – C. 363-378.
147. Müntzing A. The evolutionary significance of autopolyploidy //Hereditas. – 1936. – T. 21. – №. 2- 3. – C. 363-378.
148. Murat F., Peer Y. V., Salse J. Decoding plant and animal genome plasticity from differential paleo-evolutionary patterns and processes //Genome biology and evolution. – 2012. – T. 4. – №. 9. – C. 917-928.
149. Murre C., McCaw P. S., Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins //Cell. – 1989. – T. 56. – №. 5. – C. 777-783.
150. Neer E. J. et al. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins //Nature. – 1994. – T. 371. – №. 6495. – C. 297.
151. Nema R. et al. Flavonoid and cancer prevention–Mini review //Research in Pharmacy. – 2015. – T. 2. – №. 2.
152. Nesi N. et al. The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed //The Plant Cell. – 2001. – T. 13. – №. 9. – C. 2099-2114.
153. Nijveldt R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications– //The American journal of clinical nutrition. – 2001. – T. 74. – №. 4. – C. 418-425.

154. Nützmann H. W., Osbourn A. Gene clustering in plant specialized metabolism //Current opinion in biotechnology. – 2014. – T. 26. – C. 91-99.
155. Nützmann H. W., Huang A., Osbourn A. Plant metabolic clusters—from genetics to genomics //New Phytologist. – 2016. – T. 211. – №. 3. – C. 771-789.
156. Osbourn A. Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology //Plant physiology. – 2010. – T. 154. – №. 2. – C. 531-535.
157. O’Sullivan H. GrainGenes: a genomic database for triticeae and avena //Plant Bioinformatics: Methods and Protocols. – 2007. – C. 301-314.
158. Ogbourne S., Antalis T. M. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes //Biochemical Journal. – 1998. – T. 331. – №. 1. – C. 1-14.
159. Ohno S. Evolution by gene duplication. – Springer Science & Business Media, 2013.
160. Otto S. P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution //Annual review of genetics. – 2000. – T. 34. – №. 1. – C. 401-437.
161. Panchy N., Lehti-Shiu M. D., Shiu S. H. Gene Duplicates: from origins to implications for plant evolution //Plant Physiology. – 2016. – C. pp. 00523.2016.
162. Paterson A. H. et al. Insights from the comparison of plant genome sequences //Annual review of plant biology. – 2010. – T. 61. – C. 349-372.
163. Paterson A. H. et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses //Nature. – 2008. – T. 457. – №. LBNL-6812E.
164. Paterson A. H., Bowers J. E., Chapman B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – T. 101. – №. 26. – C. 9903-9908.
165. Patra B. et al. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. – 2013. – T. 1829. – №. 11. – C. 1236-1247.

166. Pattanaik S. et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco // *Planta*. – 2010. – T. 231. – №. 5. – C. 1061-1076.
167. Payyavula R. S., Singh R. K., Navarre D. A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism // *Journal of experimental botany*. – 2013. – T. 64. – №. 16. – C. 5115-5131.
168. Plaschke J., Ganai M. W., Röder M. S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *TAG Theoretical and Applied Genetics*. – 1995. – T. 91. – №. 6. – C. 1001-1007.
169. Podsędek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review // *LWT-Food Science and Technology*. – 2007. – T. 40. – №. 1. – C. 1-11.
170. Pourcel L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions // *Trends in plant science*. – 2007. – T. 12. – №. 1. – C. 29-36.
171. Pourmorad F., Hosseinimehr S. J., Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants // *African journal of biotechnology*. – 2006. – T. 5. – №. 11.
172. Prud'homme B., Gompel N., Carroll S. B. Emerging principles of regulatory evolution // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104. – №. suppl 1. – C. 8605-8612.
173. Reams A. B., Roth J. R. Mechanisms of gene duplication and amplification // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2015. – T. 7. – №. 2. – C. a016592.
174. Reece-Hoyes J. S. et al. Extensive rewiring and complex evolutionary dynamics in a *C. elegans* multiparameter transcription factor network // *Molecular cell*. – 2013. – T. 51. – №. 1. – C. 116-127.
175. Ren W. et al. Flavonoids: promising anticancer agents // *Medicinal research reviews*. – 2003. – T. 23. – №. 4. – C. 519-534.

176. Rhee S. Y. et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community //Nucleic acids research. – 2003. – T. 31. – №. 1. – C. 224-228.
177. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids //Free radical biology and medicine. – 1996. – T. 20. – №. 7. – C. 933-956.
178. Riechmann J. L. et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes //Science. – 2000. – T. 290. – №. 5499. – C. 2105-2110.
179. Riechmann J. L. Transcriptional regulation: a genomic overview //The Arabidopsis Book. – 2002. – C. e0085.
180. Salse J. et al. Reconstruction of monocotyledonous proto-chromosomes reveals faster evolution in plants than in animals //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – C. pnas. 0902350106.
181. Sayou C. et al. A promiscuous intermediate underlies the evolution of LEAFY DNA binding specificity //Science. – 2014. – T. 343. – №. 6171. – C. 645-648.
182. Schlapfer P. et al. Genome-wide prediction of metabolic enzymes, pathways and gene clusters in plants //Plant physiology. – 2017. – C. pp. 01942.2016.
183. Schmitz R. J. et al. DICER-LIKE 1 and DICER-LIKE 3 redundantly act to promote flowering via repression of FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis thaliana //Genetics. – 2007. – T. 176. – №. 2. – C. 1359-1362.
184. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation //Nature. – 2015. – T. 517. – №. 7534. – C. 321.
185. Sears E. R. The aneuploids of common wheat //Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull. – 1954. – T. 572. – C. 1-58.
186. Sémon M., Wolfe K. H. Consequences of genome duplication //Current opinion in genetics & development. – 2007. – T. 17. – №. 6. – C. 505-512.

187. Seoighe C., Gehring C. Genome duplication led to highly selective expansion of the *Arabidopsis thaliana* proteome //Trends in Genetics. – 2004. – T. 20. – №. 10. – C. 461-464.
188. Shahidi F., Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review //Journal of functional foods. – 2015. – T. 18. – C. 820-897.
189. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L //Food chemistry. – 2009. – T. 112. – №. 4. – C. 885-888.
190. Sheldon K. M., Elliot A. J. Goal striving, need satisfaction, and longitudinal well-being: the self-concordance model //Journal of personality and social psychology. – 1999. – T. 76. – №. 3. – C. 482.
191. Shin D. H. et al. A wheat R2R3-MYB protein PURPLE PLANT1 (TaPL1) functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis //Biochemical and biophysical research communications. – 2016. – T. 469. – №. 3. – C. 686-691.
192. Shitsukawa N. et al. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat //The Plant Cell. – 2007. – T. 19. – №. 6. – C. 1723-1737.
193. Shoeva O. Y. et al. Barley Ant1 is a homolog of maize C1 and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath //Plant Breeding. – 2015. – T. 134. – №. 4. – C. 400-405.
194. Shoeva O. Y. et al. Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black Grains of *Hordeum vulgare* //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 10. – C. e0163782.
195. Shoeva O. Y. et al. The homoeologous genes encoding chalcone-flavanone isomerase in *Triticum aestivum* L.: Structural characterization and expression in different parts of wheat plant //Gene. – 2014a. – T. 538. – №. 2. – C. 334-341.

196. Shoeva O. Y., Gordeeva E. I., Khlestkina E. K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp //Molecules. – 2014b. – T. 19. – №. 12. – C. 20266-20279.
197. Solovyev V. Statistical approaches in eukaryotic gene prediction //Handbook of statistical genetics. – 2001.
198. Stephens S. G. Possible significance of duplication in evolution //Advances in genetics. – 1951. – T. 4. – C. 247-265.
199. Stracke R. et al. Differential regulation of closely related R2R3- MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling //The Plant Journal. – 2007. – T. 50. – №. 4. – C. 660-677.
200. Stracke R., Werber M., Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana //Current opinion in plant biology. – 2001. – T. 4. – №. 5. – C. 447-456.
201. Subburaj S. et al. Phylogenetic analysis, lineage-specific expansion and functional divergence of seed dormancy 4-like genes in plants //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 6. – C. e0153717.
202. Szajdek A., Borowska E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review //Plant Foods for Human Nutrition. – 2008. – T. 63. – №. 4. – C. 147-156.
203. Tamura K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution: 30 2725-2729 //Reproduced with permission of the copyright owner. Further reproduction prohibited without permission. – 2013.
204. Tang H. et al. Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 1. – C. 472-477.
205. Tang H. et al. Synteny and collinearity in plant genomes //Science. – 2008. – T. 320. – №. 5875. – C. 486-488.

206. Tang H. et al. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps // *Genome research*. – 2008. – T. 18. – №. 12. – C. 1944-1954.
207. Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2008. – T. 7. – №. 3. – C. 1089-1099.
208. Tariq M., Paszkowski J. DNA and histone methylation in plants // *TRENDS in Genetics*. – 2004. – T. 20. – №. 6. – C. 244-251.
209. Teichmann S. A., Babu M. M. Gene regulatory network growth by duplication // *Nature genetics*. – 2004. – T. 36. – №. 5. – C. 492-496.
210. Teichmann S. A., Park J., Chothia C. Structural assignments to the *Mycoplasma genitalium* proteins show extensive gene duplications and domain rearrangements // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – T. 95. – №. 25. – C. 14658-14663.
211. Theissen G. et al. A short history of MADS-box genes in plants // *Plant Molecular Evolution*. – Springer, Dordrecht, 2000. – C. 115-149.
212. Thompson D. A. et al. Evolutionary principles of modular gene regulation in yeasts // *Elife*. – 2013. – T. 2. – C. e00603.
213. To T. K., Saze H., Kakutani T. Focus on Chromatin/Epigenetics: DNA Methylation within Transcribed Regions // *Plant physiology*. – 2015. – T. 168. – №. 4. – C. 1219.
214. Tobiason D. M., Seifert H. S. The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid // *PLoS biology*. – 2006. – T. 4. – №. 6. – C. e185.
215. Tripoli E. et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review // *Food chemistry*. – 2007. – T. 104. – №. 2. – C. 466-479.
216. Vaillau F. et al. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99. – №. 15. – C. 10179-10184.

217. Van Acker S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids //Free Radical Biology and Medicine. – 1996. – T. 20. – №. 3. – C. 331-342.
218. Veiseth S. V. et al. The SUVH4 histone lysine methyltransferase binds ubiquitin and converts H3K9me1 to H3K9me3 on transposon chromatin in Arabidopsis //PLoS genetics. – 2011. – T. 7. – №. 3. – C. e1001325.
219. Velioglu Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products //Journal of agricultural and food chemistry. – 1998. – T. 46. – №. 10. – C. 4113-4117.
220. Vinson J. A. et al. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease //Journal of agricultural and Food chemistry. – 1995. – T. 43. – №. 11. – C. 2798-2799.
221. Vision T. J., Brown D. G., Tanksley S. D. The origins of genomic duplications in Arabidopsis //Science. – 2000. – T. 290. – №. 5499. – C. 2114-2117.
222. von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering //Annu. Rev. Plant Biol. – 2007. – T. 58. – C. 1-19.
223. Walker A. R. et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein //The Plant Cell. – 1999. – T. 11. – №. 7. – C. 1337-1349.
224. Walling J. G. et al. Chromosome-level homeology in paleopolyploid soybean (*Glycine max*) revealed through integration of genetic and chromosome maps //Genetics. – 2006. – T. 172. – №. 3. – C. 1893-1900.
225. Wapinski I. et al. Gene duplication and the evolution of ribosomal protein gene regulation in yeast //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 12. – C. 5505-5510.
226. Wapinski I. et al. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi //Nature. – 2007. – T. 449. – №. 7158. – C. 54-61.
227. Waterhouse A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes //Nucleic acids research. – 2018.

228. West A. G., Gaszner M., Felsenfeld G. Insulators: many functions, many mechanisms // *Genes & development*. – 2002. – T. 16. – №. 3. – C. 271-288.
229. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // *Cell*. – 1993. – T. 75. – №. 5. – C. 855-862.
230. Wolfe K. H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization // *Nature Reviews Genetics*. – 2001. – T. 2. – №. 5. – C. 333-341.
231. Wray G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations // *Nature Reviews Genetics*. – 2007. – T. 8. – №. 3. – C. 206-216.
232. Xu W., Dubos C., Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes // *Trends in Plant Science*. – 2015. – T. 20. – №. 3. – C. 176-185.
233. Yang G. H. et al. Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-Hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway // *Acta Botanica Sinica-English Edition*. – 2004. – T. 46. – №. 5. – C. 588-594.
234. Yang J., Corces V. G. Chromatin insulators: a role in nuclear organization and gene expression // *Advances in cancer research*. – Academic Press, 2011. – T. 110. – C. 43-76.
235. Yousuf B. et al. Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2016. – T. 56. – №. 13. – C. 2223-2230.
236. Yu J. et al. The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications // *PLoS Biol*. – 2005. – T. 3. – №. 2. – C. e38.
237. Zemach A. et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation // *Science*. – 2010. – T. 328. – №. 5980. – C. 916-919.
238. Zeven A. C. Wheats with purple and blue grains: a review // *Euphytica*. – 1991. – T. 56. – №. 3. – C. 243-258.
239. Zhang J. Evolution by gene duplication: an update // *Trends in ecology & evolution*. – 2003. – T. 18. – №. 6. – C. 292-298.

240. Zhang K. et al. Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana* //PloS one. – 2007. – T. 2. – №. 11. – C. e1210.

241. Zhang X. et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* //Cell. – 2006. – T. 126. – №. 6. – C. 1189-1201.

242. Zhang Y., Butelli E., Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants //Current opinion in plant biology. – 2014. – T. 19. – C. 81-90.

243. Zilberman D. et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription //Nature genetics. – 2007. – T. 39. – №. 1. – C. 61.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Растительный материал, использованный в данном исследовании

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMusc2-BA</i> (для ячменя)
<i>H. vulgare</i> L.	Bowman (BW)	алеироновый слой	-	IPK	-
		перикарп	-		
		цветковые чешуи	-		
		стебли	-		
<i>H. vulgare</i> L.	Blue aleurone (BA)	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	PLP (Purple lemma and pericarp)	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.		перикарп	фиолетовый		
		цветковые чешуи	-		
		стебли	фиолетовые		
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_DOM	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_REC	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_01	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_02	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_03	алеироновый слой	-	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_04	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_05	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_06	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_07	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_08	алеироновый слой	голубой	IPK	+

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMusc2-BA</i> (для ячменя)
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_09	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_10	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_11	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_13	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_14	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_15	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_16	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_17	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_18	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_19	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_20	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_21	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_22	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_23	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_24	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_26	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_27	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_28	алеироновый слой	-	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_29	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_30	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_31	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_32	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_33	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_34	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_35	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_36	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_37	алеироновый слой	чёрный	IPK	-

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMusc2-BA</i> (для ячменя)
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_38	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_39	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_40	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_41	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_42	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_43	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_44	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_45	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_46	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_47	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_48	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_49	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_50	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_51	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_52	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_53	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_54	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_55	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_56	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_57	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_58	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_59	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_60	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_61	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_62	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_63	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_64	алеироновый слой	чёрный	IPK	-

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMusc2-BA</i> (для ячменя)
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_65	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_66	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_67	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_68	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_69	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_70	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_71	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_72	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_73	алеироновый слой	чёрный	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_74	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_75	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_76	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_77	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_78	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_79	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_80	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_81	алеироновый слой	чёрный	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_82	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_83	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_84	алеироновый слой	-	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_85	алеироновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_86	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_87	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_88	алеироновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_89	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_90	алеироновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_91	алеироновый слой	сливовый	IPK	+

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMusc2-BA</i> (для ячменя)
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_92	алейроновый слой	коричневый	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_93	алейроновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	OWB_94	алейроновый слой	коричневый	IPK	-
<i>H. vulgare</i> L.	AHOR6866	алейроновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	HOR17020	алейроновый слой	голубой	IPK	+
<i>H. vulgare</i> L.	Biom	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Tanay	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Vorsinsky	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Zolotnik	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Omskiy-1	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Omskiy-2	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Acha	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Signal	алейроновый слой	-	ИЦИГ	-
<i>H. vulgare</i> L.	Sobolek	алейроновый слой	-	ИЦИГ	+
<i>T. aestivum</i> L.	Саратовская 29	колеоптиле	светлый	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	(Saratovskaya 29, S29, i:S29Pp-A1pp-D1pp3)	перикарп	-		
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Ppurple	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	(i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^P)	перикарп	фиолетовый		
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29pp-A1(YP)	колеоптиле	-	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	(i:S29pp-A1pp-D1pp3)	перикарп	-		
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^P	перикарп	-	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^P	перикарп	светлый	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^{PF}	перикарп	фиолетовый	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^{PF}	перикарп	-	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Pp-A1pp-D1pp3 ^{PF}	перикарп	светлый	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Ra	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	

Вид	Сорт / каталожный номер	Орган	Цвет/ окраска	Коллекция	Присутствие аллеля <i>HvMuc2-BA</i> (для ячменя)
<i>T. aestivum</i> L.	Новосибирская 67 (Novosibirskaya 67, N67)	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	Chinese spring (CS)	колеоптиле	-	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	Chinese spring (Hope7A) (CS(H7A))	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	Chinese Spring (Hope 7B) (CS(H7B))	колеоптиле	светлый	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	Purple chance	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	
<i>T. aestivum</i> L.	Голубка (Golubka)	колеоптиле	-	ИЦИГ	
<i>T. durum</i> L.	TRI 15744	колеоптиле	тёмно-красный	ИЦИГ	

Приложение 2. Последовательности ПЦР-праймеров, использованных в настоящей работе

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Температура отжига. (°C)	Цель	Длина ПЦР- продукта (п.н.) ДНК/кДНК
<i>HvMuc1-H2</i>	GTAACAGGTGGTCGCTCATT	TTGGAGGAGACGGAGCTG	60	количественная ПЦР, секвенирование	167/167
	CAGCTCCGTCTCCTCCAAC	ACСТААТССАГТССТССГТСС	60	картирование	287/287
	ATGTTTGAATATAGTTACATGACACA	ССАТТСТСТСТТСТСТСТАТ	60	секвенирование	524/-
	ATGGGGAGGAGGGCGT	ТТААТСТГССАТСТГСАГГГ	57	секвенирование	861/711
<i>HvMuc1-H3</i>	GAAGGCAGATGGAACGAAGT	GATGATGGACCACCTGTTG	60	количественная ПЦР, секвенирование	238/177
	ATGAGGAAGGAAGGAGTGAAGA	ТТАТАГССГСАТГТССАСАГАГ	55	секвенирование	784/723

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Температура отжига. (°C)	Цель	Длина ПЦР-продукта (п.н.) ДНК/кДНК
	GGACCGGGACTAATAGGATTTTC	GTTTCGTCCSTCCTTGCTAGTC	55	секвенирование	692/-
	GGCCTAACGAGCTGAAGTATT	GTTTCGTCCSTCCTTGCTAGTC	55	секвенирование	319/-
<i>TaMpc1-A2</i>	CCGAACAGACAACGAAATCAAG	CCACCCTGGTGGCAGCT	60	количественная ПЦР, секвенирование	83/83
	ATGAGGAGGGCGTGCAGT	TTAATCCGCCATGTGCAGGGA	55	секвенирование	853/729
<i>TaMpc1-B2</i>	CCGAACAGACAACGAAATCAAG	CCGCAGTTAGAGGAAAGCCAT	60	количественная ПЦР, секвенирование	162/162
	ATGGGGATGAGGACGTGCAG	TTAATACGCCATCTGCAGGGACT	55	секвенирование	843/738
<i>TaMpc1-D2</i>	CCGAACAGACAACGAAATCAAG	GCGCCACACCGCGAT	60	количественная ПЦР, секвенирование	218/218
	ATGGGGAGGAGGGCGTGC	TTAATCTGCCATCTGCAGGGAGT	58	секвенирование	847/732
<i>TaMpc1-D3</i>	CCGAACAGACAACGAAATCAAG	CAGGTCCAGAGCTAGACAGA	60	количественная ПЦР, секвенирование	161/-
	ATGGCGACGGAAGGGGTGAAGA	TTAACCCCTCTCACTTCGTGCATCC	58	секвенирование	742/-
<i>TaMpc1-D4</i>	CCGAACAGACAACGAAATCAAG	GCCCCGGAGTTGGAGGA	60	количественная ПЦР, секвенирование	132/132
	ATGGCGACGGAAGGGGTGAAGA	TTAACCCCTCTCACTTCGTGCATCC	60	секвенирование	791/675
<i>HvMyc2</i>	CAAGTAGGTCCGAAGGCTCT	CGGGCACTTTACCTCCAACA	60	картирование	610-611/
	ATGGCGCTATCAGCTCCTC	GTCAACTGTGTCGCTGTGG	57	секвенирование	533-534
	TCTGGGAGCTGCACTTGC	CTATAGAGCTCTCTGAAGCGC	60	секвенирование	-/728
	TCTGGGAGCTGCACTTGC	CGGGCACTTTACCTCCAACA	60	секвенирование	1258-1259/

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Температура отжига. (°C)	Цель	Длина ПЦР-продукта (п.н.) ДНК/кДНК
	ACGAGCCCTGTGAGTTTATG	AGAGCCTTCGGACCTACTT	60	количественная ПЦР	101
<i>TaMyc-A1</i>	AACCATGTCATTTCCGGAGAGGA	GGCCGCCCTGTTGGATC	60	количественная ПЦР, секвенирование	283/177
	ATGGCGCTGCCAGTAGTTCGTC	TCATGGCCTGCGAATAGCTCTCT	60	секвенирование	-/1707
	TTATTAGATTAAGTATAGTTTTTTTTGGTAGAA	CAACATCAAAATACTATACTACACTAACA	50	клонирование	292/-
	TGTTAGTGTAGTATAGTATTTTGATGTTG	ACCATAACCCATAAATAAAAAAAAAAACTTCC	53	клонирование	231/-
	GGAYGATAGGTTGGTTTTTGAGTTTTTTG	CCATTACCACACTATTTTCCTTCCTTCA	57	клонирование	309/-
<i>TaMyc-A2</i>	AACCATGTCATTTCCGGAGAGGA	TCTTCCCGCCGACTTCATGA	60	количественная ПЦР, секвенирование	334/220
	ATGGCGCTGCCAGTAATTCGTC	TCAGCGCCTGCGTATAGCTTTCT	60	секвенирование	-/1697
<i>TaMyc-B1</i>	AACCATGTCATTTCCGGAGAGGA	GAGTTTTCCGGACGGCTGTTG	60	количественная ПЦР, секвенирование	347/198
	ATGGCGCTGTCAGTAGTTCGTC	TCAGCGCCTGCGTATGGCTCT	60	секвенирование	-/1692
<i>TaMyc-D1</i>	GCTCATCGTGCTTTGCGG	GCCGCCCTGTTGGATTCT	60	секвенирование	504/244
<i>TaMyc-D2</i>	AACCATGTCATTTCCGGAGAGGA	ACGGCTGTTCCGGCCA	60	количественная ПЦР, секвенирование	341/188
	ATGGCGCTGCCGGTAGTTCATC	TCATCCGGGTTCACGGCTCCA	63	секвенирование	-/1665
<i>TaMyc2.1</i>	TCTCAAGTCAATGGTCCCGTC	GATGACGGTGCCCTGCTAGTT	60	количественная ПЦР, секвенирование	205/126
<i>TaMyc2.2</i>	ATGTTCCSTAGTTCTCAAGTCA	ATGGTGTCTCTGCTAGATTGT	60	количественная ПЦР, секвенирование	208/133

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Температура отжига. (°C)	Цель	Длина ПЦР-продукта (п.н.) ДНК/кДНК
<i>TaMyс2.3</i>	GTTGTGGCTGGCGGTGACT	GCGAGGATGGATGCTTTGTC	60	количественная ПЦР, секвенирование	237/161
<i>TaMyс2.4</i>	TGAAGAAAGTTGTGGCGGGCG	GCGAGGATGGATGCTTTGTC	60	количественная ПЦР, секвенирование	246/169
<i>TaMyс2.5</i>	TGAAGAAAGTTTTGGCGGGTGG	GCGAGGATGGATGCTTTGTC	60	количественная ПЦР, секвенирование	245/169
<i>TaMyс2.6</i>	TGTTCCTGGTTCTCAAGTCAC	CTACCSTTTGCTTCAGTTCTCTA	60	количественная ПЦР, секвенирование	184/105
<i>HvWD40-1</i>	AGCACTCCACCATCGTCTA	CACTGCAGCTGGTTTATCT	60	количественная ПЦР	349
	ATGGATCAGCCCAAGCCGAC	TCAGACCCGGAGAAGCTGGA	60	секвенирование	1071
<i>HvWD40-2</i>	AAGGTGGTTGTGCTTGATATTC	CAGCATTGCCATTTCCATTG	60	количественная ПЦР	205
	ATGAACTGGAGCGTGCGGC	TCAGACCCTGAGAATCTGCAGTTT	60	секвенирование	1113
<i>TaWD40-1</i>	CACCGCAGGCTGCAAGAC	CACCCGCATCATAAACAAGAAC	60	количественная ПЦР	129
<i>TaWD40-2</i>	CCTCACTCTTCTTGCCACATT	TTTCCATTGCCTCCGCTATT	60	секвенирование	104

Приложение 3. Регуляторные гены, аннотированные в настоящем исследовании. Гены ячменя *Hordeum* были идентифицированы в базе данных IPK Barley BLAST Server, гены *Triticum* and *Aegilops* были идентифицированы в базе URGI

Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
<i>HvMpc1-H1</i>	<i>HvAnt1, HvC1</i>	<i>H. vulgare</i>	7HS	morex_contig_137164
<i>TuMpc1-A1</i>	-	<i>T. urartu</i>	7AS	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_231166
<i>TmMpc1-A1</i>	-	<i>T. monococcum</i>	7AS	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_12604
<i>AespMpc1-S1</i>	-	<i>Ae. speltoides</i>	7SS	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_38854
<i>AetMpc1-D1</i>	-	<i>Ae. tauschii</i>	7DS	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_93382
<i>TdMpc1-A1</i>	-	<i>T. durum</i>	7AS	TGAC_WGS_durum_v1_contig_176466
<i>TdMpc1-B1</i>	-	<i>T. durum</i>	7BS	TGAC_WGS_durum_v1_contig_203087
<i>TaMpc1-A1</i>	<i>TaC1-A1</i>	<i>T. aestivum</i>	7AS	IWGSC_chr7AS_ab_k71_contigs_longerthan_200_4108742
<i>TaMpc1-B1</i>	<i>TaC1-B1</i>	<i>T. aestivum</i>	7BS	IWGSC_chr7BS_ab_k71_contigs_longerthan_200_3084267
<i>TaMpc1-D1</i>	<i>TaC1-D1</i>	<i>T. aestivum</i>	7DS	IWGSC_chr7DS_ab_k71_contigs_longerthan_200_2723852
<i>HvMpc1-H2</i>	<i>HvMpc2, HvPL1</i>	<i>H. vulgare</i>	4HL	morex_contig_317820
<i>TuMpc1-A2</i>	-	<i>T. urartu</i>	4AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_39917
<i>TmMpc1-A2</i>	-	<i>T. monococcum</i>	4AL	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_152763
<i>AeshMpc1-S2</i>	-	<i>Ae. sharonensis</i>	4SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_100032
<i>AetMpc1-D2</i>	-	<i>Ae. tauschii</i>	4DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_117718
<i>TdMpc1-A2</i>	-	<i>T. durum</i>	4AL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_168597
<i>TdMpc1-B2</i>	-	<i>T. durum</i>	4BL	TGAC_WGS_durum_v1_contig_401905
<i>TaMpc1-A2</i>	-	<i>T. aestivum</i>	5AL	TGACv1_scaffold_374597_5AL

Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
<i>TaMpc1-B2</i>	<i>TaPL1-4B1</i>	<i>T. aestivum</i>	4BL	IWGSC_chr4BL_ab_k71_contigs_longerthan_200_6843762
<i>TaMpc1-D2</i>	<i>TaPL1-4D1</i>	<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr4DL_V3_ab_k71_contigs_longerthan_200_14366448
<i>HvMpc1-H3</i>	-	<i>H. vulgare</i>	4HL	morex_contig_1560519
<i>TmMpc1-A3</i>	-	<i>T. monococcum</i>	4AL	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_908028
<i>AetMpc1-D3</i>	-	<i>Ae. tauschii</i>	4DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_1005499
<i>TaMpc1-D3</i>	<i>TaPL1-4D3</i>	<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr4DL_V3_ab_k71_contigs_longerthan_200_14406147
<i>AeshMpc1-S4</i>	-	<i>Ae. sharonensis</i>	4SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_92163
<i>TaMpc1-D4</i>	<i>TaPL1-4D2</i>	<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr4DL_V3_ab_k71_contigs_longerthan_200_14366997
<i>TaMyc1</i>	<i>HvAnt2</i>	<i>H. vulgare</i>	2HL	morex_contig_1573231
<i>TaMyc-A1</i>	<i>TaMYC1.1, TaMyc1</i>	<i>T. aestivum</i>	2AL	IWGSC_chr2AL_ab_k71_contigs_longerthan_200_6338698
<i>TdMyc-A1</i>	<i>TdMYC1.1</i>	<i>T. durum</i>	2AL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_494358 TGAC_WGS_durum_v1_contig_343006
<i>TuMyc-A1</i>	<i>TuMYC1.1</i>	<i>T. urartu</i>	2AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_1358943 TGAC_WGS_urartu_v1_contig_178633
<i>TmMyc-A1</i>	<i>TmMYC1.1</i>	<i>T. monococcum</i>	2AL	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_948401 TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_933451
<i>TaMyc-A2</i>	<i>TaMYC1.2</i>	<i>T. aestivum</i>	2AL	IWGSC_chr2AL_ab_k71_contigs_longerthan_200_6437660
<i>TdMyc-A2</i>	<i>TdMYC1.2</i>	<i>T. durum</i>	2AL	TGAC_WGS_durum_v1_contig_41798 TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_5055118

Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
				TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_5068152 TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_11471
<i>TuMyc-A2</i>	<i>TuMYC1.2</i>	<i>T. urartu</i>	2AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_190389 TGAC_WGS_urartu_v1_contig_41623
<i>TmMyc-A2</i>	<i>TmMYC1.2</i>	<i>T. monococcum</i>	2AL	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_948401 TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_933451
<i>TaMyc-B1</i>	<i>TaMYC1.3</i>	<i>T. aestivum</i>	2BL	IWGSC_chr2BL_ab_k71_contigs_longerthan_200_8014948 IWGSC_chr2BL_ab_k71_contigs_longerthan_200_8082988
<i>TdMyc-B1</i>	<i>TdMYC1.3</i>	<i>T. durum</i>	2BL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_437839 TGAC_WGS_durum_v1_contig_5403445
<i>AespMyc-S1</i>	<i>AespMYC1.3</i>	<i>Ae. speltoides</i>	2SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_226068
<i>AeshMyc-S1</i>	<i>AeshMYC1.3</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	2SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_34147 TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_20011
<i>AespMyc-S2</i>	<i>AespMYC1.3.1</i>	<i>Ae. speltoides</i>	2SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_226068
<i>AeshMyc-S2</i>	<i>AeshMYC1.3.1</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	2SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_20011
<i>TaMyc-D2</i>	<i>TaMYC1.4</i>	<i>T. aestivum</i>	2DL	IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9706042 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9704205 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9888642 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9782077 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_6437991

Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
				lc GKU3SMK08I2LB5 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_1440755
<i>AetMyc-D2</i>	<i>AetMYC1.4</i>	<i>Ae. tauschii</i>	2DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_1766537 TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_90597
<i>TaMyc-D1</i>	<i>TaMYC1.5</i>	<i>T. aestivum</i>	2DL	IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_5437347 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9883633 IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9898167
<i>AetMyc-D1</i>	<i>AetMYC1.5</i>	<i>Ae. tauschii</i>	2DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_160595 TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_1770231
<i>TaMyc2</i>		<i>H. vulgare</i>	4HL	morex_contig_1563805 morex_contig_442143
<i>TaMYC2.1</i>		<i>T. aestivum</i>	5AL	IWGSC_chr5AL_ab_k95_contigs_longerthan_200_2779187
<i>TdMYC2.1</i>		<i>T. durum</i>	5AL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_307613
<i>TuMYC2.1</i>		<i>T. urartu</i>	5AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_164601
<i>TaMYC2.2</i>		<i>T. aestivum</i>	4BL	IWGSC_chr4BL_ab_k71_contigs_longerthan_200_7007833
<i>TdMYC2.2</i>		<i>T. durum</i>	4BL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_2167482
<i>AespMYC2.2</i>		<i>Ae. speltoides</i>	4SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_22231
<i>AeshMYC2.2</i>		<i>Ae. sharonensis</i>	4SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_89818
<i>TaMYC2.3</i>		<i>T. aestivum</i>	2BL	IWGSC_chr4BL_ab_k71_contigs_longerthan_200_6971693

Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
<i>TdMYC2.3</i>		<i>T. durum</i>	2BL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_163377
<i>AespMYC2.3</i>		<i>Ae. speltoides</i>	2SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_197059
<i>AeshMYC2.5</i>		<i>Ae. sharonensis</i>	4SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_16092
<i>TaMYC2.4</i>		<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9860576
<i>AetMYC2.4</i>		<i>Ae. tauschii</i>	4DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_108819
<i>TaMYC2.5</i>		<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr4DL_V3_ab_k71_contigs_longerthan_200_14471080
<i>AetMYC2.5</i>		<i>Ae. tauschii</i>	4DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_96755
<i>TaMYC2.6</i>		<i>T. aestivum</i>	4DL	IWGSC_chr4DL_V3_ab_k71_contigs_longerthan_200_14396500
<i>AetMYC2.6</i>		<i>Ae. tauschii</i>	4DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_98024
<i>HvWD40-1</i>	<i>HvWD40</i>	<i>H. vulgare</i>	6HL	morex_contig_39083
<i>TaWD40-A1</i>		<i>T. aestivum</i>	6AL	IWGSC_chr6AL_ab_k71_contigs_longerthan_200_5775988
<i>TdWD40-A1</i>		<i>T. durum</i>	6AL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_11137
<i>TuWD40-A1</i>		<i>T. urartu</i>	6AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_188458
<i>TmWD40-A1</i>		<i>T. monococcum</i>	6AL	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_933243
<i>TaWD40-B1</i>		<i>T. aestivum</i>	6BL	TA_454_ch6BL_contig02131
<i>TdWD40-B1</i>		<i>T. durum</i>	6BL	TGAC_WGS_durum_v1_contig_204160
<i>AespWD40-S1</i>		<i>Ae. speltoides</i>	6SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_1587836
<i>AeshWD40-S1</i>		<i>Ae. sharonensis</i>	6SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_94953

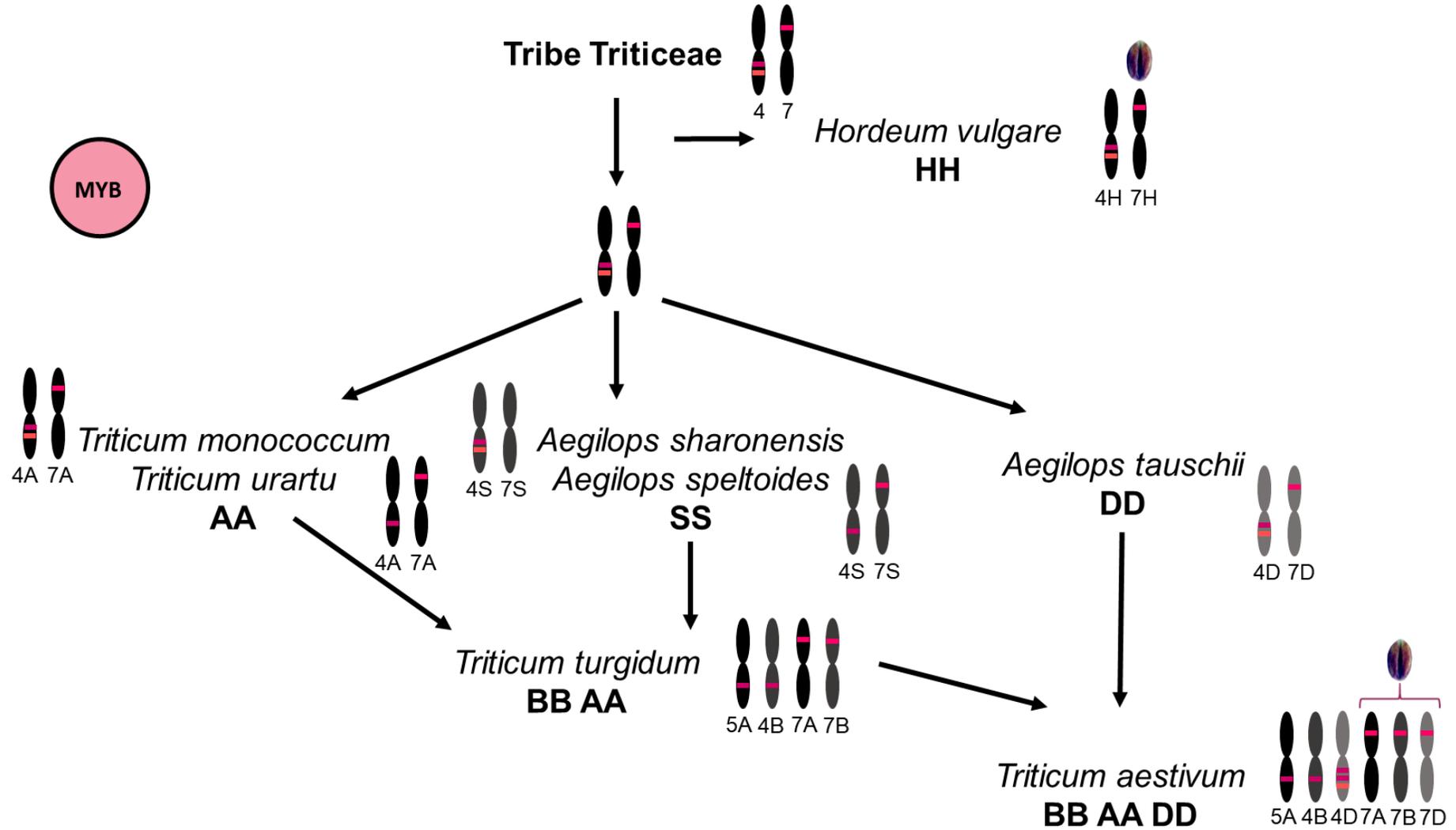
Ген	Альтернативное обозначение	Организм	Хромосома	Последовательности
<i>TaWD40-D1</i>		<i>T. aestivum</i>	6DL	TGACv1_scaffold_528482_6DL dna:scaffold:1:31420:1
<i>AetWD40-D1</i>		<i>Ae. tauschii</i>	6DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_144026
<i>HvWD40-2</i>		<i>H. vulgare</i>	6HS	morex_contig_44548
<i>TaWD40-A2</i>		<i>T. aestivum</i>	6AS	IWGSC_chr6AS_ab_k71_contigs_longerthan_200_4360143
<i>TdWD40-A2</i>		<i>T. durum</i>	6AS	TGAC_WGS_durum_v1_contig_508891 TGAC_WGS_durum_v1_contig_195858
<i>TuWD40-A2</i>		<i>T. urartu</i>	6AS	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_42510
<i>TmWD40-A2</i>		<i>T. monococcum</i>	6AS	TGAC_WGS_monococcum_v1_contig_904541
<i>TaWD40-B2</i>		<i>T. aestivum</i>	6BS	TGACv1_scaffold_516533_6BS dna:scaffold:1:17194:1
<i>TdWD40-B2</i>		<i>T. durum</i>	6BS	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_157087
<i>AespWD40-S2</i>		<i>Ae. speltoides</i>	6SS	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_479818
<i>AeshWD40-S2</i>		<i>Ae. sharonensis</i>	6SS	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_1092486
<i>AetWD40-D2</i>		<i>Ae. tauschii</i>	6DS	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_219841

Приложение 4. Оцененное число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (Ka), количество синонимичных замен на синонимичные сайты (Ks) и соотношение Ka / Ks для генов *R2R3-MYB*, *bHLH MYC* и *WD40* трибы Triticeae

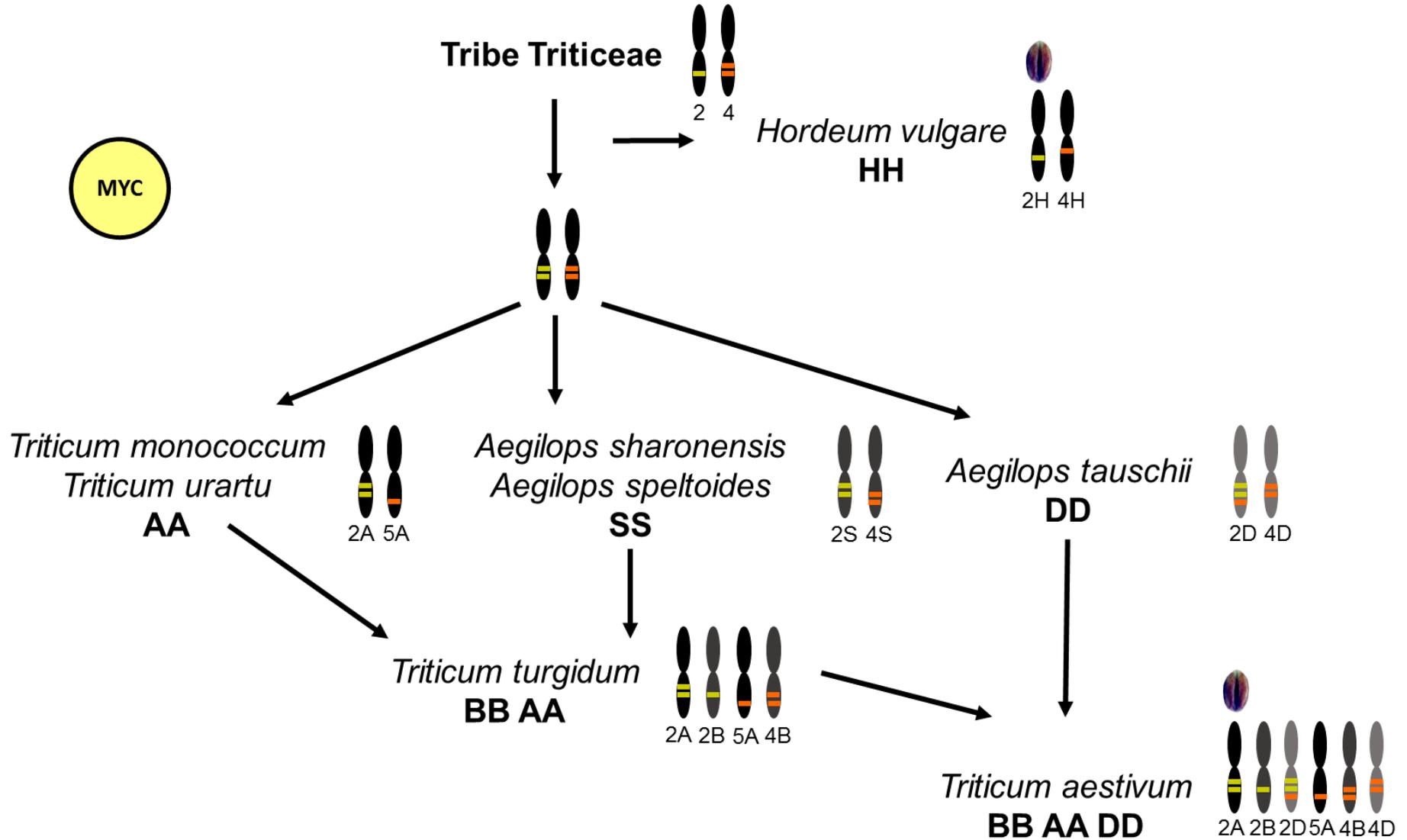
<i>Myb</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>	<i>bHLH</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>	<i>WD40</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>
<i>HvMpc1-H1</i>	0,205	0,265	0,723	<i>HvMyc1</i>	0,149	0,209	0,711	<i>HvWD40-1</i>	0,128	0,396	0,226
<i>HvMpc1-H2</i>	0,187	0,277	0,683	<i>HvMyc2</i>	0,215	0,277	0,777	<i>HvWD40-2</i>	0,115	0,372	0,197
<i>HvMpc1-H3</i>	0,251	0,332	0,820	<i>TaMyc1.1</i>	0,148	0,188	0,786	<i>TaWD40-A1</i>	0,127	0,393	0,197
<i>TaMpc1-A1</i>	0,182	0,250	0,641	<i>TaMyc1.2</i>	0,150	0,204	0,735	<i>TaWD40-B1</i>	0,127	0,382	0,203
<i>TaMpc1-B1</i>	0,183	0,231	0,691	<i>TaMyc1.3</i>	0,149	0,189	0,789	<i>TaWD40-D1</i>	0,127	0,382	0,201
<i>TaMpc1-D1</i>	0,181	0,245	0,643	<i>TaMyc1.4</i>	0,141	0,190	0,745	<i>TaWD40-A2</i>	0,116	0,351	0,217
<i>TaMpc1-A2</i>	0,171	0,210	0,697	<i>TaMyc1.5</i>	0,182	0,235	0,776	<i>TaWD40-B2</i>	0,116	0,346	0,226
<i>TaMpc1-B2</i>	0,180	0,225	0,746	<i>TaMyc2.1</i>	0,153	0,214	0,716	<i>TdWD40-A1</i>	0,127	0,386	0,200
<i>TaMpc1-D2</i>	0,179	0,248	0,665	<i>TaMyc2.2</i>	0,180	0,206	0,874	<i>TdWD40-B2</i>	0,116	0,344	0,237
<i>TaMpc1-D3</i>	0,185	0,257	0,717	<i>TaMyc2.3</i>	0,162	0,193	0,843	<i>TdWD40-A2</i>	0,117	0,349	0,239
<i>TaMpc1-D4</i>	0,251	0,323	0,782	<i>TaMyc2.4</i>	0,161	0,212	0,762	<i>TmWD40-A1</i>	0,127	0,385	0,201
<i>TdMpc1-A1</i>	0,181	0,247	0,630	<i>TaMyc2.5</i>	0,159	0,189	0,845	<i>TuWD40-A1</i>	0,127	0,396	0,196
<i>TdMpc1-B1</i>	0,183	0,231	0,691	<i>TaMyc2.6</i>	0,215	0,266	0,805	<i>TmWD40-A2</i>	0,116	0,354	0,209
<i>TdMpc1-B2</i>	0,180	0,225	0,746	<i>TdMyc1.1</i>	0,148	0,188	0,786	<i>TuWD40-A2</i>	0,115	0,353	0,208
<i>TdMpc1-A2</i>	0,171	0,210	0,697	<i>TdMyc1.2</i>	0,150	0,204	0,735	<i>AespWD40-S1</i>	0,127	0,381	0,205
<i>TuMpc1-A1</i>	0,181	0,247	0,630	<i>TdMyc1.3</i>	0,190	0,232	0,819	<i>AetWD40-D1</i>	0,127	0,382	0,201
<i>TmMpc1-A1</i>	0,190	0,264	0,688	<i>TdMyc2.1</i>	0,166	0,214	0,776	<i>AeshWD40-S2</i>	0,116	0,349	0,206
<i>AespMpc1-S1</i>	0,181	0,249	0,659	<i>TdMyc2.2</i>	0,180	0,206	0,874	<i>AespWD40-S2</i>	0,116	0,346	0,226
<i>AetMpc1-D1</i>	0,181	0,245	0,643	<i>TdMyc2.3</i>	0,162	0,193	0,843	<i>AetWd40-D2</i>	0,116	0,347	0,210
<i>TuMpc1-A2</i>	0,171	0,210	0,697	<i>TmMyc1.1</i>	0,158	0,200	0,793				
<i>TmMpc1-A2</i>	0,171	0,210	0,697	<i>TuMyc1.1</i>	0,148	0,187	0,793				
<i>AeshMpc1-B2</i>	0,185	0,264	0,640	<i>TmMyc1.2</i>	0,154	0,198	0,777				
<i>AeshMpc1-B3</i>	0,178	0,222	0,870	<i>TuMyc1.2</i>	0,153	0,200	0,766				
<i>TmMpc1-A3</i>	0,239	0,330	0,757	<i>AspMyc1.3</i>	0,143	0,186	0,768				
<i>AetMpc1-D2</i>	0,179	0,248	0,665	<i>AtMyc1.4</i>	0,142	0,191	0,744				
<i>AetMpc1-D3</i>	0,251	0,323	0,782	<i>TuMyc2.1</i>	0,153	0,206	0,741				

<i>Myb</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>	<i>bHLH</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>	<i>WD40</i>	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka / Ks</i>
				<i>AshMyc2.2</i>	0,165	0,213	0,773				
				<i>AshMyc2.3</i>	0,158	0,200	0,794				
				<i>AspMyc2.3</i>	0,174	0,190	0,918				
				<i>AtMyc2.4</i>	0,167	0,209	0,799				
				<i>AtMyc2.5</i>	0,167	0,189	0,885				
				<i>AtMyc2.6</i>	0,215	0,266	0,805				

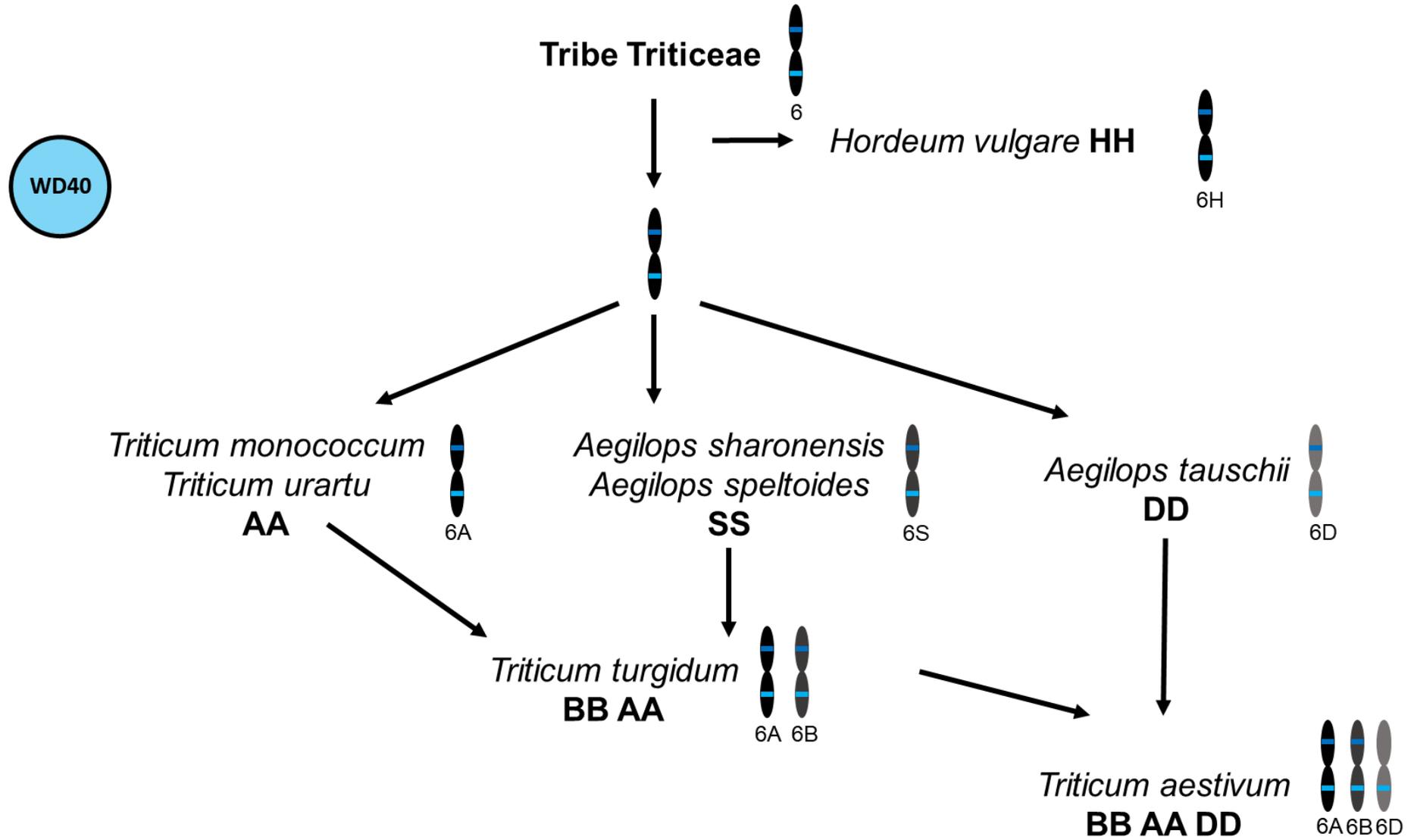
Приложение 5. Предполагаемая схема появления генов *R2R3-MYB* в трибе Triticeae



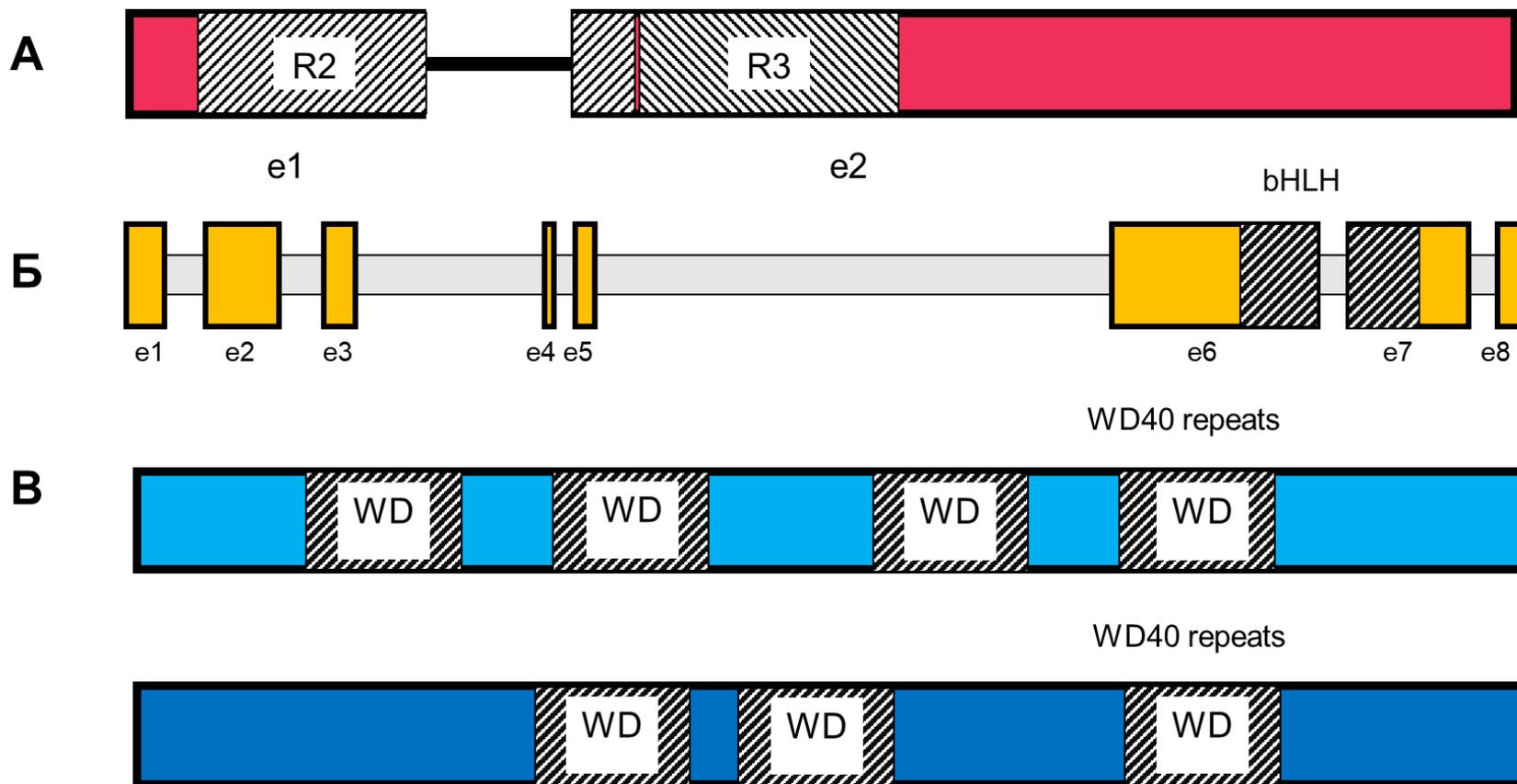
Приложение 6. Предполагаемая схема появления генов *bHLH* типа *MYC* в трибе Triticeae



Приложение 7. Предполагаемая схема появления генов *WD40* в трибе Triticeae



Приложение 8. Структура идентифицированных генов а) *R2R3-MYB*, б) *bHLH MYC*-типа, в) *WD40-1* и *WD40-2*

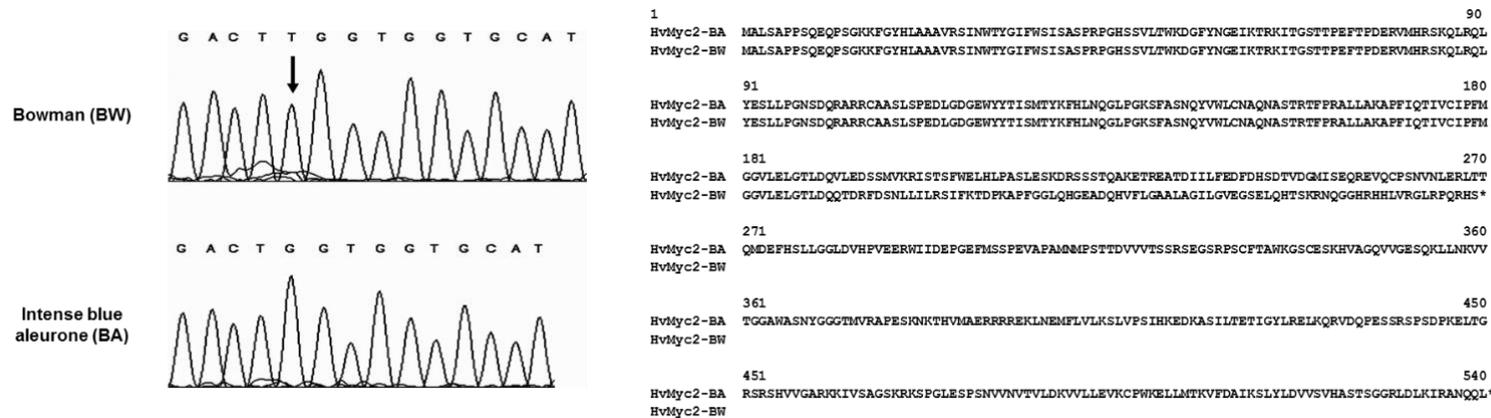


Приложение 9. Множественное выравнивание MYC. Анализируемый белковый мотив - область bHLH (IPR011598).

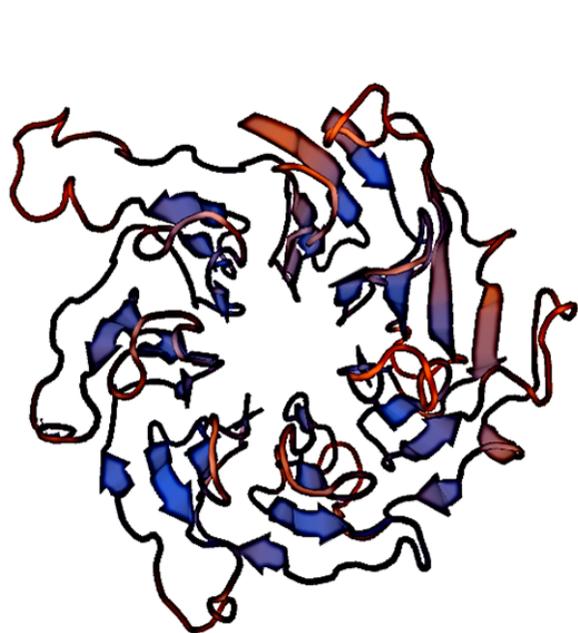
Множественное выравнивание последовательности выполнялось с использованием программы MultAlin. Красный - высокий консенсус, синий - низкий консенсус, чёрный - нейтральный.

	1				56	
HvMyc1	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETIAYLRELE QRVEEL	
TaMyc1.1	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETITYLRELE QKVEEL	
TaMyc1.2	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETIAYLRELE QKVEEL	
TaMyc1.3	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETIAYLRELE QKVEEL	
TaMyc1.4	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETIAYLRELE QKVEEL	
TaMyc1.5	NTKNHVISER	RRREKLNEMF	LILKSLVPSI	HKVDKASILA	ETIAYLRDWS TRWRS*	
	Basic		Helix 1		Loop	Helix 2

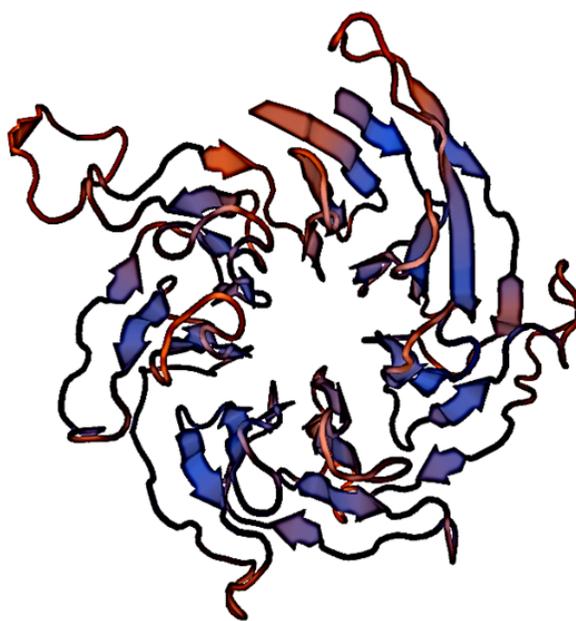
Приложение 10. Вставка одного нуклеотида в гене *HvMyc2* и выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей аллелей *HvMyc2-BA* и *HvMyc2-BW*



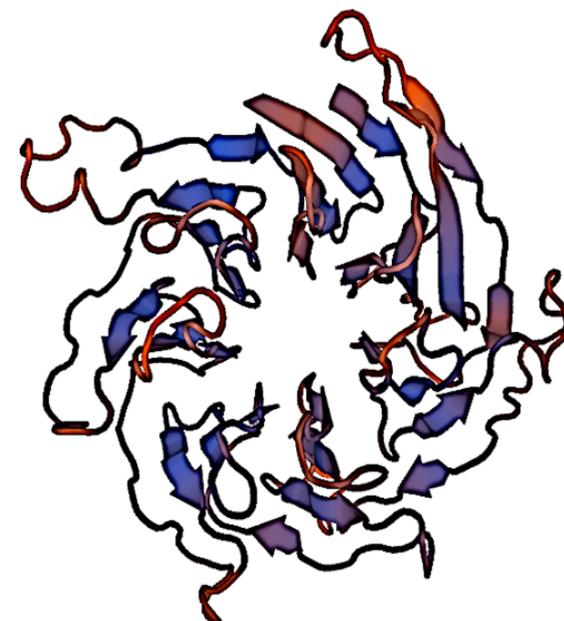
Приложение 11. Предсказанная структура белка WD40 для кукурузы (ZmPAC-1), пшеницы (TaWD40-A1) и ячменя (HvWD40)



ZmPAC-1



TaWD40-A1



HvWD40

Приложение 12. Предполагаемые *цис*-действующие регуляторные элементы, идентифицированные в промоторах *Mpc1* (600 пн от ATG). Промоторный анализ был выполнен с использованием базы данных PLACE. "+" - кодирующая цепь, "-" - некодирующая цепь.

Мотив	Последовательность	Ген	Положение	Описание
GT1CONSENSUS	GRWAAW	<i>TaMpc1-A2</i>	5 (+) 69 (+) 95 (+)	S000198
		<i>TaMpc1-D2</i>	9 (+) 58 (+) 59 (+) 77 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	581 (+) 582 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	337 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	83 (-) 580 (+)	
MYCONSENSUSAT	CANNTG	<i>TaMpc1-A2</i>	33 (-) 33 (+) 64 (-) 64 (+) 103 (+) 110 (-) 110 (+) 134 (-) 134 (+) 269 (-) 269 (+) 477 (-)	S000407
		<i>TaMpc1-B2</i>	89 (-) 89 (+) 214 (-) 214 (+) 310 (-) 310 (+) 520 (-) 520 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	2 (-) 2 (+) 70 (-) 70 (+) 151 (-) 151 (+) 272 (-) 272 (+) 481 (-) 481 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	112 (-) 112 (+) 448 (-) 448 (+) 512 (-) 512 (+) 575 (-) 575 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	363 (-) 363 (+) 534 (-) 534 (+)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	68 (-) 68 (+) 121 (-) 121 (+) 188 (-) 188 (+) 221 (-) 221 (+) 272 (-) 272 (+)	
GATABOX	GATA	<i>TaMpc1-A2</i>	47 (+) 549 (+) 585 (+)	S000039
		<i>TaMpc1-B2</i>	25 (-) 368 (+) 565 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	221 (+) 548 (+) 585 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	81 (+) 374 (+) 376 (-) 588 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	30 (+) 404 (+) 476 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	85 (-) 144 (-) 150 (+) 178 (-) 303 (-) 384 (+) 386 (-)	
MYBIAT	WAACCA	<i>TaMpc1-A2</i>	60 (+)	S000408
		<i>TaMpc1-B2</i>	370 (+)	

Мотив	Последовательность	Ген	Положение	Описание
		<i>TaMpc1-D3</i>	1 (-)	
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	<i>TaMpc1-A2</i>	64 (+) 110 (+) 421 (+)	S000409
		<i>TaMpc1-D3</i>	252 (-) 534 (+) 575 (-) 590 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	321 (-)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	35 (+) 188 (-)	
MYBCORE	CNGTTR	<i>TaMpc1-A2</i>	385 (-)	S000176
		<i>TaMpc1-D4</i>	46 (+) 94 (-) 321 (+) 478 (-)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	245 (-)	
CAATBOX1	CAAT	<i>TaMpc1-A2</i>	103 (+) 105 (-) 151 (-) 263 (-) 378 (+) 525 (+)	S000028
		<i>TaMpc1-B2</i>	28 (+) 256 (+) 304 (-) 413 (-) 419 (+) 455 (+) 505 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	23 (+) 91 (+) 266 (-) 382 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	72 (+) 198 (-) 205 (-) 289 (+) 301 (+) 442 (-)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	357 (-) 472 (+)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	266 (-) 340 (-) 375 (-) 381 (+)	
WRKY71OS	TGAC	<i>TaMpc1-A2</i>	107 (+) 185 (-) 225 (+) 329 (+) 481 (+)	S000447
		<i>TaMpc1-B2</i>	5 (+) 238 (-) 250 (+) 529 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	15 (+) 83 (+) 122 (+) 187 (-) 206 (-) 228 (+) 332 (+) 485 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	88 (+) 110 (-) 141 (-) 245 (+) 508 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	78 (-) 86 (-) 223 (+) 492 (+) 538 (+)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	20 (+) 116 (+) 193 (-) 331 (+) 448 (+)	
DOFCOREZM	AAAG	<i>HvMpc1-H3</i>	89 (-)	S000265
		<i>TaMpc1-A2</i>	129 (+) 278 (-) 288 (-) 570 (+)	
		<i>TaMpc1-B2</i>	54 (-) 69 (+) 319 (-) 329 (-) 556 (+) 570 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	281 (-) 291 (-) 570 (+)	

Мотив	Последовательность	Ген	Положение	Описание
		<i>TaMpc1-D3</i>	9 (-) 64 (-) 93 (+) 135 (-) 333 (-) 365 (-)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	229 (-) 382 (-) 442 (+)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	139 (+) 159 (-) 169 (+) 183 (-) 197 (+) 291 (-) 351 (+) 443 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	4 (-) 75 (-) 306 (-) 526 (+)	
SORLIP1AT	GCCAC	<i>TaMpc1-A2</i>	428 (+)	S000482
		<i>TaMpc1-B2</i>	469 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	432 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	168 (+) 295 (+)	
SORLIP2AT	GGGCC	<i>TaMpc1-A2</i>	139 (+) 144 (-) 426 (+)	S000483
		<i>TaMpc1-B2</i>	467 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	296 (-) 430 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	208 (+) 209 (-)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	108 (-) 195 (-) 268 (-) 287 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	228 (-) 336 (+)	
SORLIP5AT	GAGTGAG	<i>TaMpc1-D2</i>	498 (-)	S000486
		<i>TaMpc1-D4</i>	551 (-)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	457 (-)	
MYBCOREATCYCB1	AACGG	<i>TaMpc1-A2</i>	237 (+) 278 (+)	S000502
		<i>TaMpc1-B2</i>	463 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	240 (+) 416 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	467 (-)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	82 (+) 341 (+)	
		<i>HvMpc1-H2</i>	389 (+)	
		<i>HvMpc1-H3</i>	46 (-) 424 (+)	
CGCGBOXAT	VCGCGB	<i>TaMpc1-A2</i>	242 (-) 242 (+) 365 (-) 365 (+) 437 (-) 437 (+)	S000501

Мотив	Последовательность	Ген	Положение	Описание
		<i>TaMpc1-B2</i>	283 (-) 283 (+) 406 (-) 406 (+) 442 (-) 442 (+) 478 (-) 478 (+)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	17 (-) 17 (+) 85 (-) 85 (+) 245 (-) 245 (+) 369 (-) 369 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	146 (-) 146 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	43 (-) 43 (+) 128 (-) 128 (+) 346 (-) 346 (+) 459 (-) 459 (+) 494 (-) 494 (+)	
		<i>TaMpc1-A2</i>	318 (-)	
CBFHV	RYCGAC	<i>TaMpc1-B2</i>	151 (-) 151 (+) 359 (-)	S000497
		<i>TaMpc1-D2</i>	321 (-)	
		<i>TaMpc1-A2</i>	428 (-)	
BOXIIICCHS	ACGTGGC	<i>TaMpc1-B2</i>	469 (-)	S000229
		<i>TaMpc1-D2</i>	432 (-)	
		<i>TaMpc1-B2</i>	194 (+)	
E2FCONSENSUS	WTTSSCSS	<i>TaMpc1-D2</i>	19 (-) 87 (-) 293 (+)	S000476
		<i>TaMpc1-B2</i>	4 (+)	
WBOXATNPR1	TTGAC	<i>TaMpc1-B2</i>	4 (+)	S000390
		<i>TaMpc1-D2</i>	332 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	88 (+) 245 (+) 508 (+)	
WBOXNTERF3	TGACY	<i>HvMpc1-H2</i>	331 (+)	S000457
		<i>TaMpc1-D3</i>	588 (+)	
		<i>TaMpc1-D4</i>	476 (+)	
IBOXCORE	GATAA	<i>HvMpc1-H3</i>	84 (-)	S000199
		<i>TaMpc1-B2</i>	23 (-)	
		<i>TaMpc1-D2</i>	548 (+)	
IBOX	GATAAG	<i>TaMpc1-D4</i>	404 (+)	S000124
		<i>HvMpc1-H2</i>	313 (+)	
		<i>TaMpc1-D3</i>	373 (+)	
MYBST1	GGATA	<i>HvMpc1-H3</i>	383 (+)	S000180

Мотив	Последовательность	Ген	Положение	Описание
GT1CONSENSUS	GRWAAW	<i>TaMpc1-D4</i>	337 (+)	S000198
		<i>HvMpc1-H3</i>	83 (-) 580 (+)	
DRECRTCOREAT	RCCGAC	<i>TaMpc1-D4</i>	35 (+) 58 (-) 120 (+) 138 (+) 189 (+) 201 (-) 259 (-) 279 (+) 292 (-) 310 (-)	S000418
BIHD1OS	TGTCA	<i>HvMpc1-H2</i>	20 (-) 116 (-) 192 (+)	S000498
CACTFTPPCA1	YACT	<i>HvMpc1-H3</i>	10 (+) 217 (+) 352 (-) 396 (-) 402 (-) 575 (-)	S000449

Приложение 13. Множественное выравнивание промоторных последовательностей *HvMpc1-H2*. Выравнивание выполнялось с использованием программы MultAlin.

1		90
<i>HvMpc2-BA</i>	ATGTTTGAATATAGTTACATGACACATAAATCCACAACGGGTGGGATGCTCCCTCCATGCTCACACACATCTGGGATGCCCC-----	
<i>HvMpc2-BW</i>	ATGTTTGAATATAGTTACATGACACATAAATCCACAACGGGTGGGATGCTCCCTCCATGCTCACACACATCTGGGATGCCCCCTTCGGT	
<i>HvMpc2-OWB</i>	ATGTTTGAATATAGTTACATGACACATAAATCCACAACGGGTGGGATGCTCCCTCCATGCTCACACACATCTGGGATGCCCCCTTCGGT	
<i>HvMpc2-OWB</i>	ATGTTTGAATATAGTTACATGACACATAAATCCACAACGGGTGGGATGCTCCCTCCATGCTCACACACATCTGGGATGCCCCCTTCGGT	
	91	180
<i>HvMpc2-BA</i>	-----GGTCGG-----TGGTGACACAGGTGAGCCGTCGAGCAAAAGCTACGTGCTCTGGCTTCTTTGGACTCAAAGGGCAACGA	
<i>HvMpc2-BW</i>	TTTGGGGGTCCGGGTGCCTCGTGCTGACACAGGTGAGCCGTCGAGCAAAAGCTACGTGCTCTGGCTTCTTTGGACTCAAAGGGCAACGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	TTTGGGGGTCCGGGTGCCTCGTGCTGACACAGGTGAGCCGTCGAGCAAAAGCTACGTGCTCTGGCTTCTTTGGACTCAAAGGGCAACGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	TTTGGGGGTCCGGGTGCCTCGTGCTGACACAGGTGAGCCGTCGAGCAAAAGCTACGTGCTCTGGCTTCTTTGGACTCAAAGGGCAACGA	
	181	270
<i>HvMpc2-BA</i>	TCCTTTTCAGTTGTCAAAGAAATACGACATAGTACATCTCACCTGCCCGCGATCTTGGACGGCGAAGAAATGGCCGCGCTGTTCAATTGG	
<i>HvMpc2-BW</i>	TCCTTTTCAGTTGTCAAAGAAATACGACATAGTACATCTCACCTGCCCGCGATCTTGGACGGCGAAGAAATGGCCGCGCTGTTCAATTGG	
<i>HvMpc2-OWB</i>	TCCTTTTCAGTTGTCAAAGAAATACGACATAGTACATCTCACCTGCCCGCGATCTTGGACGGCGAAGAAATGGCCGCGCTGTTCAATTGG	
<i>HvMpc2-OWB</i>	TCCTTTTCAGTTGTCAAAGAAATACGACATAGTACATCTCACCTGCCCGCGATCTTGGACGGCGAAGAAATGGCCGCGCTGTTCAATTGG	
	271	360
<i>HvMpc2-BA</i>	ACAAATGGAGCCTTCCTAGCCTTTTGGTCCATCTAACTCTGAGATAAGTGTGCTCAGCATGACTGTGGATTGAAGGTGCAAAGCAGGTC	
<i>HvMpc2-BW</i>	ACAAATGGAGCCTTCCTAGCCTTTTGGTCCATCTAACTCTGAGATAAGTGTGCTCAGCATGACTGTGGATTGAAGGTGCAAAGCAGGTC	
<i>HvMpc2-OWB</i>	ACAAATGGAGCCTTCCTAGCCTTTTGGTCCATCTAACTCTGAGATAAGTGTGCTCAGCATGACTGTGGATTGAAGGTGCAAAGCAGGTC	
<i>HvMpc2-OWB</i>	ACAAATGGAGCCTTCCTAGCCTTTTGGTCCATCTAACTCTGAGATAAGTGTGCTCAGCATGACTGTGGATTGAAGGTGCAAAGCAGGTC	
	361	450
<i>HvMpc2-BA</i>	CACGTAGACGCGCTACTGTACAATGCTAAACGGGTCCACGTGACGCGCTGATGACTAAATACAG-AACAACCTGCTGCCCAAAGATGA	
<i>HvMpc2-BW</i>	CACGTAGACGCGCTACTGTACAATGCTAAACGGGTCCACGTGACGCGCTAATGACTAAATACGGCAACAACCTGCTGCCCAAAGATGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	CACGTAGACGCGCTACTGTACAATGCTAAACGGGTCCACGTGACGCGCTAATGACTAAATACGGCAACAACCTGCTGCCCAAAGATGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	CACGTAGACGCGCTACTGTACAATGCTAAACGGGTCCACGTGACGCGCTAATGACTAAATACGGCAACAACCTGCTGCCCAAAGATGA	
	451	522
<i>HvMpc2-BA</i>	CGGACCCCTCACTCTCTCGTCTCTAACACAACACAACACACACCCGGAGAAGCGATAGAGAGAAGGAGAGA	
<i>HvMpc2-BW</i>	CGGACCCCTCACTCTCTCGTCTCTAACACAACACAACACACACCCGGAGAAGAG--ATAGAGAGAAGGAGAGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	CGGACCCCTCACTCTCTCGTCTCTAACACAACACAACACACACCCGGAGAAGAG--ATAGAGAGAAGGAGAGA	
<i>HvMpc2-OWB</i>	CGGACCCCTCACTCTCTCGTCTCTAACACAACACAACACACACCCGGAGAAGAG--ATAGAGAGAAGGAGAGA	

Приложение 15. Предполагаемые *цис*-регуляторные элементы, идентифицированные в промоторах генов *MYC* второй гомеологической группы хромосом. "+" - кодирующая цепь, "-" - некодирующая цепь

Мотив	Последовательность	Ген	Цепь		Описание
			"+"	"-"	
TSS		<i>TaMyc1.1</i>		+1 (307)	transcription start sites (TSS) were predicted by alignment with the wheat <i>TaMyc1</i> (<i>TaMyc1.1</i>) gene
		<i>TaMyc1.2</i>		+1 (350)	
		<i>TaMyc1.3</i>		+1 (314)	
		<i>TaMyc1.4</i>		+1 (354)	
		<i>TaMyc1.5</i>		+1 (304)	
RRE E-box motif	CANNTG	<i>TaMyc1.1</i>	-248; -25	-248; -25	R response element (RRE); MYC recognition binding site
		<i>TaMyc1.2</i>	-269	-269	
		<i>TaMyc1.3</i>	-237; -32	-237; -32	
		<i>TaMyc1.4</i>	-273	-273	
		<i>TaMyc1.5</i>	-233	-233	
TATA-box	TATATAA TATATtA TATAgAA TATATtA TATATAA	<i>TaMyc1.1</i>	-32		critical element for accurate transcription initiation around -30 of transcription start
		<i>TaMyc1.2</i>	-29		
		<i>TaMyc1.3</i>	-39		
		<i>TaMyc1.4</i>	-29		
		<i>TaMyc1.5</i>	-29		
G-box ACGT motif	ACGT	<i>TaMyc1.1</i>	-266	-266	ACGT-containing elements required for etiolation-induced expression of the early responsive to dehydration gene
		<i>TaMyc1.2</i>	-299; -73	-299; -73	
		<i>TaMyc1.3</i>	-267; -240	-267; -240	
		<i>TaMyc1.4</i>	-303; -73; -53	-303; -73; -53	
		<i>TaMyc1.5</i>	-263; -100	-263; -100	
GTGA motif	GTGA	<i>TaMyc1.1</i>	-195; -120	-220; -215; -65	motif found in the promoter late pollen gene
		<i>TaMyc1.2</i>	-334; -221; -135	-252; -247; -203; -64	
		<i>TaMyc1.3</i>	-300; -196; -121	-221; -216	
		<i>TaMyc1.4</i>	-338; -221; -135	-331; -252; -247; -203; -64	
		<i>TaMyc1.5</i>	-296; -192; -117	-289; -217; -212; -62	
A core of TGAC- containing W-box	TGAC	<i>TaMyc1.1</i>	-232	-221; -210; -66	transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells
		<i>TaMyc1.2</i>	-265	-242; -183; -65	
		<i>TaMyc1.3</i>	-233	-222; -211	
		<i>TaMyc1.4</i>	-269	-242; -183; -65	
		<i>TaMyc1.5</i>	-229	-218; -207	
DOF core	AAAG	<i>TaMyc1.1</i>	-123	-84	core site required for binding of Dof proteins
		<i>TaMyc1.2</i>	-138	-85	
		<i>TaMyc1.3</i>	-124	-71	
		<i>TaMyc1.4</i>	-138	-85	
		<i>TaMyc1.5</i>	-120	-81	

Мотив	Последовательность	Ген	Цепь		Описание
			“+”	“-”	
SORLIP	GGGCC	<i>TaMyc1.1</i>	-115	-243	sequences over-represented in light-induced promoters (SORLIP), <i>guc</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
		<i>TaMyc1.2</i>	-130	-276	
		<i>TaMyc1.3</i>	-116	-244	
		<i>TaMyc1.4</i>	-130	-280	
		<i>TaMyc1.5</i>	-112	-240	
GT1 consensus	GRWAAW R=A/G W=A/T	-			<i>guc</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
		<i>TaMyc1.3</i>	-153		
		-			
MYB1	WAACCA W=A/T	<i>TaMyc1.1</i>	-150	-150	MYB recognition site found in the promoters of dehydration-responsive genes and many other genes
		<i>TaMyc1.2</i>	-177	-177	
		<i>TaMyc1.3</i>	-163		
		<i>TaMyc1.4</i>	-177	-177	
		<i>TaMyc1.5</i>	-147	-147	
ARE	TGGTTT	<i>TaMyc1.1</i>		-150	<i>guc</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
		<i>TaMyc1.2</i>		-177	
		-			
		<i>TaMyc1.4</i>		-177	
MYCATRD22	CTAACCA	-			binding site for MYB in dehydration-responsive gene
		<i>TaMyc1.3</i>	-164		
		-			
ANAERO2 consensus	AGCAGC	<i>TaMyc1.1</i>	-160		motif in promoters of anaerobic genes involved in the fermentative pathway (anaerobic set 1)
		-			
		<i>TaMyc1.5</i>	-157		
TC-rich repeats	GTTTCTgAC	-			<i>guc</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
		<i>TaMyc1.2</i>		-183	
		<i>TaMyc1.4</i>		-183	
Inr element	YTCANTYY Y=C/T	<i>TaMyc1.1</i>	-178		Initiator elements (Inr) found in gene promoters without TATA-boxes; light-responsive transcription on Inr
		<i>TaMyc1.2</i>	-253; -204		
		<i>TaMyc1.3</i>	-179		
		<i>TaMyc1.4</i>	-253; -204		
		<i>TaMyc1.5</i>	-174		
CGTCA motif	CGTCA	<i>TaMyc1.1</i>	-222; -211		<i>guc</i> -acting regulatory element associated with MeJA-responsiveness
		-			

Мотив	Последовательность	Ген	Цепь		Описание
			“+”	“-”	
		<i>TaMyc1.3</i>	-223; -212	-233	
		-			
		<i>TaMyc1.5</i>	-219; 208		
GARE motif	AAACAGA	-			gibberellin-responsive element (GARE)
		<i>TaMyc1.2</i>	-239		
		<i>TaMyc1.3</i>	-208		
		<i>TaMyc1.4</i>	-233		
		<i>TaMyc1.5</i>	-204		
W-box	TTGAC	<i>TaMyc1.1</i>		-210	fungal elicitor responsive element, <i>guc</i> -regulatory elements
		<i>TaMyc1.2</i>		-242	recognized specifically by salicylic acid (SA)-induced
		<i>TaMyc1.3</i>		-211	WRKY DNA binding proteins
		<i>TaMyc1.4</i>		-242	
		<i>TaMyc1.5</i>		-207	
BIHD1	TGTCA	-			binding site of BELL homeodomain transcription factor
		<i>TaMyc1.2</i>	-243		
		-			
		<i>TaMyc1.4</i>	-243		
		-			
MBS	CAACTG	-			MYB binding site (MBS) involved in drought-inducibility
		<i>TaMyc1.2</i>	-269		
		-			
		<i>TaMyc1.4</i>	-273		
		-			
E2F consensus sequence	WTTSSCSS W=A/T S=G/C	<i>TaMyc1.1</i>	-246		E2F-DP-binding motif
		<i>TaMyc1.2</i>	-279		
		<i>TaMyc1.3</i>	-247		
		<i>TaMyc1.4</i>	-283		
		<i>TaMyc1.5</i>	-243		
CCAAT-box	CCAAT	<i>TaMyc1.1</i>	-249		common <i>guc</i> -acting element in promoter and enhancer regions
		-			
		<i>TaMyc1.3</i>			
		-			
		<i>TaMyc1.5</i>			
CAAT-box	CAAAT	-			common <i>guc</i> -acting element in promoter and enhancer regions
		-			
		<i>TaMyc1.3</i>	-237		
		-			
		<i>TaMyc1.5</i>	-233		
C-box	GACGTC	<i>TaMyc1.1</i>	-267	-267	one of ACGT elements; bZIP proteins binding site
		<i>TaMyc1.2</i>	-300	-300	
		<i>TaMyc1.3</i>	-268	-268	
		<i>TaMyc1.4</i>	-304	-304	

Мотив	Последовательность	Ген	Цепь		Описание
			“+”	“-”	
		<i>TaMyc1.5</i>	-264	-264	
DRE	RYCGAC R=A/G Y=C/T	<i>TaMyc1.1</i> - <i>TaMyc1.3</i> -	-270 -271	-270 -271	dehydration-responsive element (DRE)
		<i>TaMyc1.5</i>	-267	-267	
Core CRT/DRE motif	GTCGAC	<i>TaMyc1.1</i> - <i>TaMyc1.3</i> - <i>TaMyc1.5</i>	-270 -271 -267	-270 -271 -267	C-repeat/ dehydration responsive element (CRT/DRE) motif; DNA binding is regulated by temperature
PHR1-binding sequence	GNATATNC	- <i>TaMyc1.2</i> - <i>TaMyc1.4</i> -	-294 -298		motif in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes
SURE core	GAGAC	- <i>TaMyc1.2</i> - <i>TaMyc1.4</i> -	-302 -306		core of sulfur-responsive element (SURE)

Приложение 16. Множественное выравнивание промоторных последовательностей *TaMyc*. Выравнивание выполнялось с использованием программы MultAlin.

```

1
TaMyc1.1   АТААТТ  --GCATCG-- GCAGGCCGTG  TTTCCCTTAGG  CGTCGTCGA-  -CGTCGATTA  TTCTGCGCCA  ATTGGCCCTA  CGAATGACTT  AC----CCCG  -TCACCTCAC  CGTCAAGCAG  AAA-----T
TaMyc1.3  АТААТТGCAC  --GCAGTGAT  GCTCGCCGTG  TTTCCCTTAGG  CGTCGTCGA-  -CGTCGATTA  TTGTGTGCCT  ATTGGCCCTA  CAAATGACGT  AC----CCCG  -TCACCTCAC  CGTCAAACAG  ACA-----T
TaMyc1.5   АТТГ  --GCAGTGAT  GCTCACCGTG  TTTCCCTCAGG  CGTCGTCGA-  -CGTCGATCA  TTGTGTGCCT  ATTGGCCCTA  CAAATGACTT  GC----CCCG  -TCACCTCAC  CGTCAAACAG  ACA-----T
TaMyc1.2  АТААТТGCAT  CGGCAGTGAT  GCACACCGTG  TTTCCCTCAGG  CGTCGTCGAG  ACGTCGAATA  TTCAGTGCCT  ATTGGCCCTA  CAACTGACTT  GC----CCCG  CTCACTTCAC  TGTCAAACAG  AAACAGAGAT
TaMyc1.5  АТААТТGCAT  CGGCAGTGAT  GCTCACCGTG  TTTCCCTCAGG  CGTCGTCGAG  ACGTCGAATA  TTCAGTGCCT  ATTGGCCCTA  CAACTGACTT  GC----CCCG  CTCACTTCAC  TGTCAAACAG  AAACAGAGAT

131
TaMyc1.1  CGGTGAGGAT  TTCGTGCATC  TCAGTCCAGT  TTTACTAAGC  AGCGAGAAAA  CCAAGCAGGC  A-----  ---CTACACT  AGCTAGAAAG  TGATGGGCCT  AATTGTATGT  TAGTGCAGCA  CAGTA-----
TaMyc1.3  CGGTGAGGAT  TTCGTGCATC  TCAGTCCAGT  TTTACTAACC  AGCGAGAAAA  TCAAGCAGGC  A-----  ---CTACACT  AGCTAGAAAG  TGATGGGCCT  AATTGTATGT  TGGTGCAGTA  CAGTA-----
TaMyc1.5  CGGTGAGGAT  TTCGTGCATC  TCAGTCCAGT  TTTACTAAGC  AGCGAGAAAA  CCAAGCAGGC  A-----  ---CTACACT  GGCTAGAAAG  TGATGGGCCT  AATTGTACGT  TGGTGCCGGA  CAGTA-----
TaMyc1.2  CGGTGAGGAC  TCGGTGCATC  TCACTCCATT  TTTACTA-GC  AGTCAGAAAA  CCAAGCAGGC  ATGCATTGTA  CТАCTACACT  AGCTAGAAAG  TGATGGGCCT  AATTGTATGT  TGGCGCAGTA  CAGTAGTGTC
TaMyc1.4  CGGTGAGGAC  TCGGTGCATC  TCACTCCATT  TTTACTA-GC  AGTCAGAAAA  CCAAGCAAGC  ATGCATTGTA  CТАCTACACT  AGCTAGAAAG  TGATGGGCCT  AATTGTATGT  TGGCGCAGTA  CAGTAGTGTC

261
TaMyc1.1  -----C  TTTGATGTTG  --CGTCGCAG  TCACTCGTTG  CTCGTCTGC-  -TGCAAGGAC  AGATCTATAT  AACATATGCC  CTGGATTCTT  G-TACATT
TaMyc1.3  -----G  TGT----CCG  --AATAGTAC  TTTGCTGTTG  C--GTCTGC-  -TGCAAGGAC  AGATCTATAG  AACATATGCC  CTGGATTCTT  GGTACATT
TaMyc1.5  -----C  TTTGATGTTG  --CGTCGCAC  TCACTCGTTG  CTCGTCTGC-  -TGCAAGGAC  AGATCTATAT  AA----TGCC  CTGGATTCTT  GGTACATT
TaMyc1.2  CGAACAGTAC  TTTGCTGTTG  AACGTCGCAG  TCACTCGTTC  CTCGTCTGCG  CTGCAAGGAC  AGATCTATAT  TA----TGCC  CTGGATTCTT  GGTGCATT
TaMyc1.4  CGAACAGTAC  TTTGCTGTTG  AACGTCGCAG  TCACTCGTTC  CACGCTGCG  CTGCAAGGAC  AGATCTATAT  TA----TGCC  CTGGATTCTT  GGTGCATT

358

```

Приложение 17. Содержание антоцианов в coleoptile пшеницы

Саратовская 29, подверженной разным типам стресса

