

*На правах рукописи*

Курбидаева Амина Султановна

**Изучение роли гена *ICE2 Arabidopsis thaliana* в контроле устойчивости  
растений к холоду**

Специальность 03.02.07 – генетика

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

**Научный руководитель:**  
д.б.н., профессор Ежова Т.А.

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор Ежова Татьяна Анатольевна.

**Официальные оппоненты:**

**Карлов Геннадий Ильич**, доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства факультета агрономии и биотехнологии, заведующий Центром молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева»;

**Горюнова Светлана Валерьевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года в \_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук и на сайте [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru).

Факс: (499) 132-89-62

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Температура – один из главных факторов окружающей среды, лимитирующих рост, развитие и продуктивность растений, поэтому устойчивость к холоду растений является хозяйственно значимым признаком. Эффективность адаптации растений к холоду зависит от количественных изменений в содержании определенных белков, метаболитов, антиоксидантов и гормонов, липидного состава мембран, а также ряда организменных ответов, таких как задержка роста и репродукции (Thomashow, 1999; Войников, 2013). Генетический контроль и эволюция этого индуцируемого ответа привлекают внимание исследователей уже в течение 30 лет, с тех пор как было показано, что холод изменяет экспрессию некоторых генов растений (Guy et al., 1985).

Использование модельного растения *A.thaliana* открыло новые возможности для изучения устойчивости к холоду. Изучение мутантов с измененной чувствительностью к холоду и широкоформатные исследования транскриптома с помощью гибридизации на микрочипах показали, что в развитии устойчивости участвуют сотни генов (Chinnusamy et al., 2003; Zarka et al., 2003; Lee, Henderson et al. 2005; Vogel et al., 2005).. Наибольший интерес представляют гены, кодирующие транскрипционные факторы, так как они, с одной стороны, действуют на широкий круг генов-мишеней путем активации или репрессии, с другой, их действие достаточно специфично и может являться основой для генетической инженерии и создания устойчивых к холоду хозяйственно ценных культур. Гены объединяют в группы, обладающие единой регуляцией (регулоны), важнейшими из которых считаются регулон CBF/DREB1 (Shinozaki et al., 2003; Guy et al. 2008; Hua 2009; Thomashow, 2010), и AREB/ABF, индуцируемый абсцизовой кислотой (АБК) (Choi et al., 2000). В состав регулона CBF/DREB1 входят гены транскрипционных факторов - мишеней гена *ICE1*, считавшегося главным регулятором холодового ответа у *A.thaliana* (Chinnusamy, Ohta et al. 2003, Lee, Henderson et al. 2005). Регулон CBF/DREB1 включает до 84% всех генов, активируемых холодом (Vogel et al., 2005). Трансгенные растения с повышенной экспрессией генов *ICE1* и *CBF* обладают повышенной устойчивостью к холоду (Liu et al., 1998; Jaglo-Ottosen et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2000; Chinnusamy et al., 2003). В то же время, абсцизовая кислота является главным стрессовым гормоном растений (Tuteja, 2007), а повышенная экспрессия генов регулона AREB/ABF приводит к повышению устойчивости ко многим типам стресса, в том числе к гипотермии (Kim et al., 2004).

Недавно был идентифицирован гомолог *ICE1*, ген *ICE2*, который по данным исследований, проведенных в ИОГен РАН под руководством профессора В.А. Тарасова, также участвует в регуляции ответа на холод (Fursova et al., 2009). Вместе с тем, известно, что зачастую паралогичные гены выполняют различающиеся функции в организме, либо их функции узкоспециализированы. Для выяснения функциональных особенностей гена *ICE2*, его места в генной сети, регулирующей адаптацию растений к холоду, и связи с регулонами CBF и AREB/ABF необходимы дальнейшие исследования. Эффективным подходом для решения этих вопросов является исследование трансгенных растений *A.thaliana*, суперэкспрессирующих ген *ICE2* под контролем конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S (*35S::ICE2*). Такие растения были созданы в ИОГен РАН и любезно предоставлены нам профессором В.А. Тарасовым для работы. Другим

информативным подходом является изучение природной внутривидовой изменчивости исследуемого гена и анализ ее ассоциации с фенотипом. Базы данных по внутривидовому полиморфизму геномов *A.thaliana*, которые постоянно пополняются благодаря работе над проектом «1001 геном *A.thaliana*» (Nordborg and Weigel, 2008; Weigel and Mott, 2009), открывают сегодня новые возможности для такого рода исследований. Использование всех этих подходов должно позволить получить наиболее полное представление о функции и эволюции гена. Кроме того, естественная адаптация северных рас *A.thaliana* к холоду позволяет изучать на их примере роль различных генов в устойчивости к гипотермии. Расы *A. thaliana* из республики Карелия, которые были любезно предоставлены нам О.М. Федоренко и другими сотрудниками Карельского Научного Центра РАН, являются ценным материалом для подобных исследований.

**Цель исследования:** Изучение структуры гена *ICE2* и его роли в контроле устойчивости растений *A.thaliana* к холоду, сравнение внутри- и межвидового полиморфизма паралога *ICE2* и *ICE1* и анализ возможных путей эволюции *ICE2*.

**Задачи работы:**

1. Изучение структуры кодирующей и промоторной областей генов *ICE1* и *ICE2*;
2. Филогенетический анализ белков *ICE1* и *ICE2* из разных видов растений;
3. Анализ внутривидового и межвидового полиморфизма генов *ICE1* и *ICE2*; сравнение уровней внутривидовой изменчивости генов в расах *A.thaliana* из разных климатических зон;
4. Изучение устойчивости к холоду и экспрессии генов ответа на холод в разных тканях трансгенных растений *A.thaliana*, суперэкспрессирующих ген *ICE2* (*35S::ICE2*);
5. Изучение экспрессии гена *ICE2* и холод-индуцируемых генов в природных расах *A.thaliana*.

**Научная новизна работы.** Изучена роль гена *ICE2* в контроле устойчивости *A.thaliana* к гипотермии. Впервые установлено, что ген способствует развитию устойчивости к холоду специфически в меристемах. Показано, что устойчивость достигается регуляцией различных путей ответа на холод - как СВФ-зависимой, так и связанной с повышенным синтезом АБК. Впервые изучена эволюция генов *ICE1* и *ICE2*, а также внутривидовой и межвидовой полиморфизм по этим генам. Впервые выявлена связь между уровнем полиморфизма *ICE2* с клинальной изменчивостью к холоду северных и южных рас *A.thaliana*. Проведенные исследования расширяют представления о молекулярной эволюции и нуклеотидном разнообразии генов-регуляторов холодового ответа, служат лучшему пониманию механизмов адаптации растений к климату.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Понимание механизмов устойчивости к холоду – необходимое условие для развития биотехнологии и создания устойчивых к стрессам хозяйственно ценных культур. Нами показано, что ген *ICE2* имеется в геноме растений семейства капустных и играет важную роль в защите меристемы *A.thaliana* от холодового стресса и адаптации растений к холодным климатическим условиям. Эти новые знания открывают потенциальную возможность для создания устойчивых к гипотермии хозяйственно-ценных видов Капустных на основе функционально активных аллелей *ICE2*.

Результаты работы вносят существенный вклад в изучение ответа растения на холод, в понимание путей эволюции генов и таксонов, расширяют представления о микроэволюции генов после дупликации в свете адаптаций к климату, а также указывают на потенциальную роль регуляторных генов как основы адаптивного фенотипического разнообразия в природе.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, Россия, 2010 и 2012 гг.), III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, Россия, 2012 г.), Международной конференции “Plant Genetics and Breeding Technologies” (Вена, Австрия, 2013 г.), Международной конференции “Plant Genome Evolution 2013: A Current Opinion Conference” (Амстердам, Нидерланды, 2013 г.). Диссертация апробирована на заседании кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, который включает 264 источника, и приложения. Диссертация содержит 28 рисунков и 14 таблиц, приложение содержит 5 рисунков и 3 таблицы.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 11 тезисов докладов и материалов конференций.

## Основное содержание работы

### Материалы и методы

**Растительный материал и условия выращивания.** В работе использовали 9 природных рас *A.thaliana* из коллекции кафедры генетики МГУ (Янушкевич, 1985), полученных из международного банка семян ABRC и КарНЦ РАН, а также трансгенные линии *A.thaliana Super-Half2-ICE2*, полученные из ИОГен РАН (табл. 3). Растения выращивались в асептических условиях на агаризованной среде Квитко (Квитко, 1960), или в смеси почвы и вермикулита (2:1) в условиях теплицы.

Таблица 3. Линии *A.thaliana*, использованные в работе

Название	Источник
Col-M (Columbia), лабораторная линия K-8	Коллекция кафедры генетики МГУ
Dj-M (Dijon), лабораторная линия K-1	Коллекция кафедры генетики МГУ
Cvi-0 (Cape Verde Islands), CS902	Международный банк семян ABRC
Шуйская	КарНЦ РАН
Царевичи	КарНЦ РАН
Кончезеро	КарНЦ РАН
Медвежьегорск	КарНЦ РАН
Радколье	КарНЦ РАН
Большой Климецкий	КарНЦ РАН
<i>Super-Half2-ICE2</i>	ИОГен РАН

**Получение гомозиготных линий трансгенных растений с суперэкспрессией гена *ICE2*.** Трансгенные линии *A.thaliana* с суперэкспрессией *ICE2* были предоставлены нам в виде семян поколения T2. Для выделения гомозиготных линий мы изучили расщепление на устойчивость к гербициду “Basta”. Из поколения T5 были отобраны независимые гомозиготные линии D7 и D14.

**Воздействие гипотермии.** Для акклиматизации двухнедельные растения помещали на сутки на 4°C при постоянном свете 100 мЕ. Для физиологического теста на устойчивость к замораживанию при -5°C применялся метод из Xin et al., 2007, с изменениями.

**Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).** Подготовленный материал высушивали при критической точке на установке “Dryer HCP-2” (Hitachi, Япония), покрывали слоем золота с палладием толщиной 150 Å на ионно-напылительной установке “IB-3 Ion Coater” (Eiko, Япония) и исследовали с помощью микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония).

**Изучение относительной экспрессии генов** проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторах АНК-32 (Россия) и MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, США) с набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green (Синтол, Россия). РНК выделяли и очищали с помощью RNeasy Plant Mini Kit и RNase-Free DNase Set (Qiagen, США). Для синтеза первой цепи кДНК использовали реактивы и протокол фирмы «Силекс» (Россия). Анализ относительного содержания транскриптов проводили по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001), используя две биологические и три технические повторности. В качестве референсных были использованы гены PP2A и At5g46630, которые характеризуются конститутивной экспрессией (Czechowski et al., 2005).

**Секвенирование ДНК** проводили в ЦКП “Геном”.

**Методы биоинформатики** Ортологи белков ICE1 и ICE2 искали в базах данных *Phytozome* v9.1 (<http://www.phytozome.net/>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и UniProt (<http://www.uniprot.org/>) с помощью алгоритма BLASTP (Altschul et al., 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности *ICE1* и *ICE2* различных рас *A.thaliana* искали в базе данных 1001 геном (<http://1001genomes.org/>). Визуализацию и сравнение последовательностей проводили в программе BioEdit v7.2.0 (Hall 1999), множественные выравнивания проводили с использованием программы ClustalW (Thompson et al. 1994), анализ полиморфизма - DnaSP 5.2 (Rozas et al. 2003), DNA Slider (McDonald 1998) и UGENE v1.11.5 (Okonechnikov et al. 2012). Для филогенетического анализа использовали методы максимального правдоподобия и присоединения соседей (Saitou and Nei, 1987) в пакете MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011, <http://www.megasoftware.net>), с применением эволюционных моделей p-distance и Poisson substitution model, соответственно. Оценка достоверности узлов выполнялась с использованием бутстрэп-теста (Felsenstein, 1985). Цис-элементы промотора искали в AthaMap database (Steffens et al., 2005, <http://www.athamap.de/>) и PLACE (Higo et al., 1999; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). Данные микроэрепей были получены из GENEVESTIGATOR (Zimmermann et al., 2004) и Arabidopsis e-FP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Вторичную структуру и консервативные домены белка изучали с помощью PSIPRED (McGuffin et al., 2000, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), Emboss epestfind (Rogers et al. 1986,

<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>), NLStradamus (Nguyen et al. 2009, <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>), Poly(A) Signal Miner (Liu et al. 2005, <http://dnafsmineer.bic.nus.edu.sg/PolyA.html>) KinasePhos 2.0 (Wong et al., 2007, <http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/index.html>), MyHits (Pagni et al., 2007, <http://myhits.isb-sib.ch/>), KEGG Genes Database (Kanehisa, 2002, <http://www.genome.jp/kegg/genes.html>), UniProtKB (Magrane and Consortium, 2011, <http://www.uniprot.org/uniprot/>). Синтенные участки хромосом идентифицировали с помощью PGDD (Lee et al., 2012, <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>) и SynFind (Lyons et al., 2008; <https://genomeevolution.org/CoGe/SynFind.pl>). Для регистрации нуклеотидных последовательностей генов в GenBank NCBI использовали Bankit (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>). Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel и STATISTICA 6.1 (StatSoft. Inc.).

**Вычисление времени дубликации гена** с помощью  $K_s$  как характеристики темпа молекулярной эволюции проводили по формуле  $T = K_s/2\lambda$  (Lynch and Conery, 2000), где  $\lambda$  - это скорость молекулярной эволюции, составляющая для *A.thaliana*  $1.5610283 \times 10^{-8}$  замен на синонимичный сайт в год (Blanc and Wolfe, 2004).

## Результаты и обсуждение

### 1. Анализ филогении гена *ICE2*

Построение дендрограммы последовательностей 79 белков-ортологов *ICE1* и *ICE2* из 61 вида растений показало, что ортологи *ICE2* присутствуют только в геномах семейства Капустные. Семейство формирует отдельную ветвь на общем древе, на которой с высокой степенью бутстреп-поддержки выделяются клады *ICE1* и *ICE2* (рис. 1). Гены *ICE1* и *ICE2*

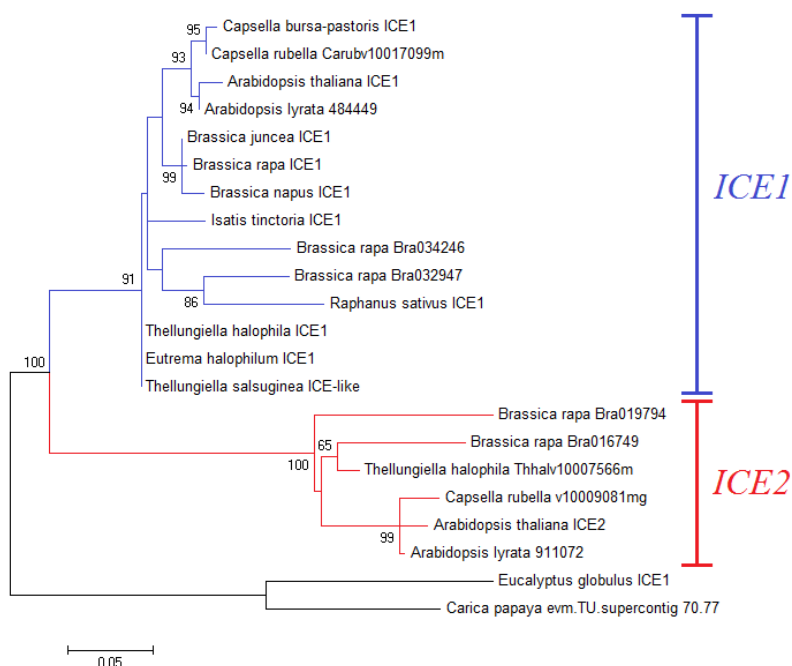


Рис. 1. Дендрограмма 20 гомологов белков ICE Капустных. Дерево укоренено относительно ICE-подобных белков из *Eucalyptus globulus* и *Carica papaya*. Бутстреп рассчитан для 1000 повторов.

*A.thaliana* могли возникнуть в результате дубликации предкового гена. Расчет даты происхождения дубликации показал, что она произошла около 17.9 млн лет назад. Возраст семейства Капустные оценивается от 24 до 40 млн лет (Franzke et al., 2011). Внутри семейства произошли дубликации генома, приведшие к палеоплоидии, самая недавняя из которых произошла 29-35 миллионов лет назад (Simillion et al., 2002; Bowers et al., 2003; Maere et al., 2005). Таким образом, дубликация генов *ICE*

предположительно произошла уже после выделения Капустных в самостоятельную группу, но не в ходе полногеномной дупликации. Этот вывод подтвержден также с помощью анализа микросинтезии, который выявил 18 пар гомологичных генов в участках локализации генов *ICE1* и *ICE2* (1 и 3 хромосомы *A.thaliana*).

## 2. Структурные особенности генов *ICE1* и *ICE2*

Ген *ICE2* локализован на 1 хромосоме в прямой ориентации, *ICE1* - на 3ей хромосоме в обратной ориентации, оба гена состоят из 4 экзонов и 3 интронов. Белки *ICE1* и *ICE2* состоят из 494 и 450 аминокислотных остатков, соответственно. *ICE1* и *ICE2* имеют ряд общих доменов (рис. 2). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков ICE 12 видов Капустных позволило выявить специфичные для белка *ICE2* домены. Это серин-богатая и лейцин-богатая области. С помощью компьютерного моделирования вторичной структуры белка установлено, что эти домены формируют дополнительные альфа-спирали. Кроме того, выявлен специфический для *ICE2* участок из 19 отрицательно заряженных аминокислот. Таким образом, выявлена структурная дивергенция последовательностей *ICE1* и *ICE2*.

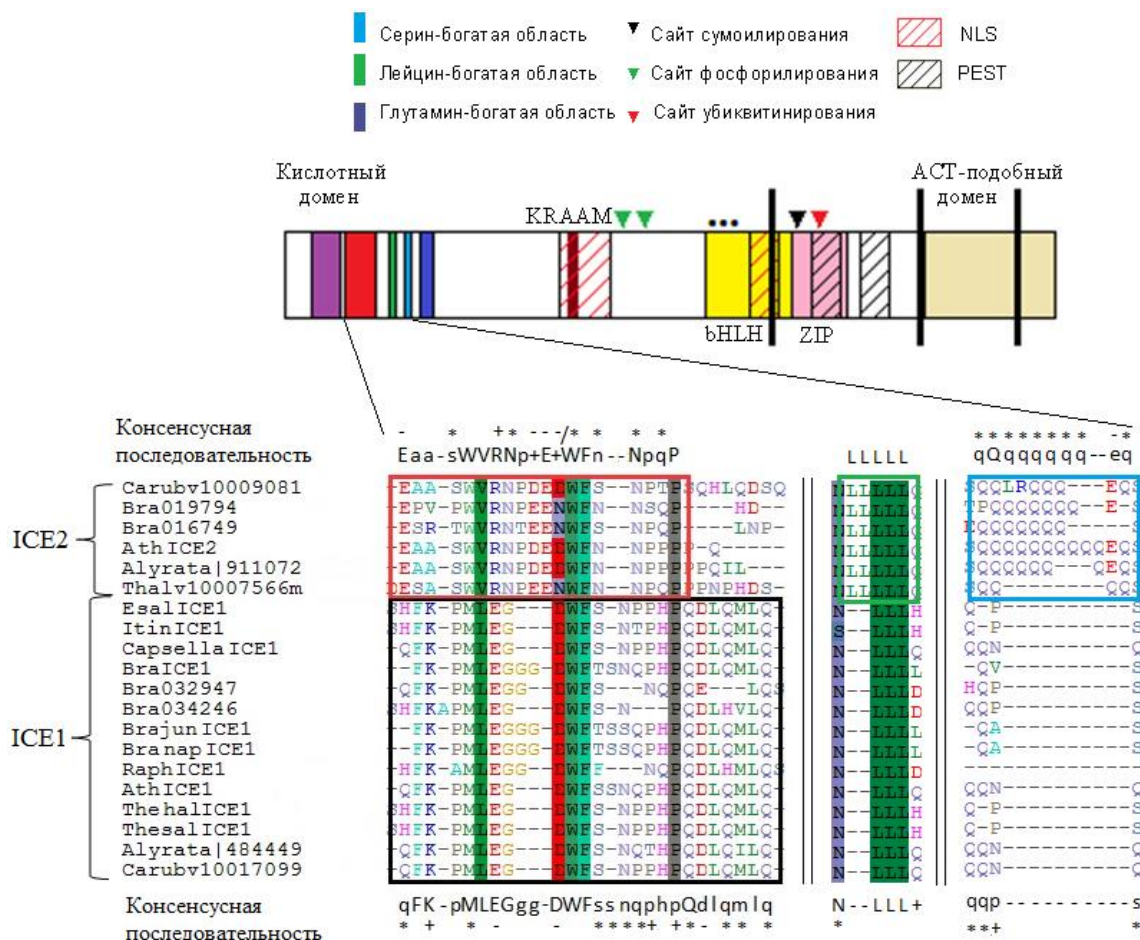


Рис. 2. Анализ структуры белков *ICE1* и *ICE2* Капустных. Схема белка представлена над множественным выравниванием белков. Границы экзонов отмечены вертикальными линиями. Специфичные для белка *ICE2* домены отмечены \*. Точками отмечены ключевые для связывания ДНК а.о. Специфичный для *ICE1* и *ICE2* домены обведены на выравнивании в красную и черную рамки, соответственно. Консенсусные последовательности белков представлены над и под выравниваниями: 1. Аминокислотный консенсус: строчные буквы обозначают аминокислоту, присутствующую в 100%, прописные – в более чем 50% последовательностей, + обозначает равную представленность двух аминокислот. 2. Химический консенсус: +/- - заряженная аминокислота, \* - полярная.



### 3. Биоинформатический анализ промоторных областей генов *ICE1* и *ICE2* и сравнение характера их экспрессии

Поскольку мутации в промоторных и регуляторных участках могут приводить к субфункционализации дублированных генов (Lynch and Force, 2000), мы произвели поиск в компьютерных базах данных цис-элементов в 5'-области генов *ICE* (1-1,2 т.п.н. от сайта начала трансляции). Выявлены специфичные для *ICE2* консервативные элементы, потенциально влияющие на экспрессию гена в апексе и под действием биотического стресса.

Уровень экспрессии *ICE2* (в отличие от *ICE1*) в апексах выше, чем в листьях, более чем в 2 раза (рис. 3). Анализ баз данных микроэзрей подтвердил наши данные по экспрессии. Таким образом, анализ экспрессии и цис-элементов промотора указывают на то, что ген *ICE2* экспрессируется преимущественно в апикальной части побега, а также потенциально обладает новыми, по сравнению с *ICE1*, функциями.

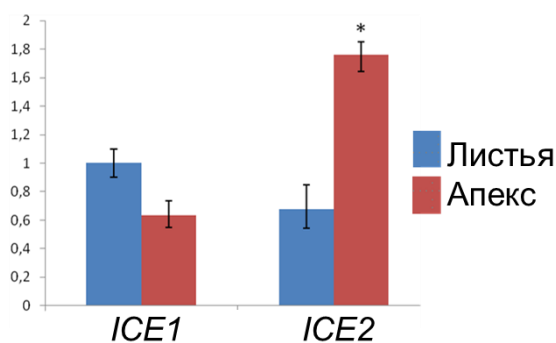


Рис. 3. Анализ экспрессии генов *ICE*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно экспрессии *ICE1* в листьях. Значения представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. \* выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии *ICE1* в листьях (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

### 4. Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* среди рас *A.thaliana* из разных широт

Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* изучали с помощью 60 рас *A.thaliana* различных широт. Последовательности генов были секвенированы или взяты из базы 1001 геном (<http://1001genomes.org/>). Расы были поделены на три группы согласно широте их географического ареала. Нуклеотидное разнообразие оценивали по числу вариабельных сайтов, числу гаплотипов, показателю  $\pi$  и другим критериям. Ген *ICE2* характеризуется большим числом гаплотипов, т.е. наборов сцепленных однонуклеотидных замен: 46 SNP-гаплотипов и 10 InDel-гаплотипов обнаружено среди 60 изученных аллелей. Ген *ICE1* представлен меньшим числом гаплотипов: 24 SNP- и 7 InDel-гаплотипов (табл. 2). Нуклеотидное разнообразие по гену *ICE1* в 2 раза ниже, чем по *ICE2*, что указывает на более слабое давление отбора на *ICE2* (табл. 2).

Таблица 2. Оценка нуклеотидного полиморфизма генов *ICE1* и *ICE2* *A. thaliana*. МИС – минимально-информативные сайты S – число вариабельных сайтов, h – число гаплотипов,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие, S(i) – число сайтов InDel, h(i) - число InDel гаплотипов.

Ген	Группа	Широта ( $^{\circ}$ N)	S		h	$\pi$	S(i)	h(i)	Число рас со стоп-кодоном
			Синглетоны	МИС					
<i>ICE1</i>	Северная	>50	16	13	13	0,00579	8	3	0
	Умеренная	43-50	8	11	11	0,00776	8	6	0
	Южная	<43	23	11	11	0,00457	6	4	0
	Все		18	24	24	0,000678	7	9	0
<i>ICE2</i>	Северная	>50	6	17	17	0,00653	3	4	0
	Умеренная	43-50	13	15	15	0,01139	8	9	0
	Южная	<43	13	20	20	0,01075	7	8	4
	Все		20	64	46	0,0109	8	10	4

Наиболее интересным оказалось сравнение уровней полиморфизма генов *ICE* для трех групп рас. Оказалось, что расы из Южной и Умеренной группы имеют показатели нуклеотидного разнообразия по гену *ICE2*, отличные от Северной группы (табл. 2). Нуклеотидное разнообразие по несинонимичным заменам в Южной группе в 4.5 раза выше, чем в Северной и в 1.6 раза – чем в Умеренной. Следовательно, расы из южных регионов испытывали пониженное давление стабилизирующего отбора на последовательность гена *ICE2*. Клиная изменчивость по уровню полиморфизма служит подтверждением роли *ICE2* в контроле устойчивости к холоду. Удивительно, что подобной изменчивости не выявлено для *ICE1*. Возможно, регуляция акклиматизации не является основной функцией гена *ICE1*.

## 5. Распределение внутривидового полиморфизма по последовательности генов *ICE* в связи с доменной структурой продукта гена

Анализ распределения «молчащих» сайтов (замен в некодирующих участках гена и синонимичных замен) и несинонимичных замен по последовательности генов *ICE1* и *ICE2* показал неравномерное распределение несинонимичных замен по гену *ICE2* (рис. 4). Наибольшее число несинонимичных замен в гене *ICE2* наблюдается в варибельной части первого экзона, где присутствуют два пика: в глутамин-богатом домене и предположительном сайте фосфорилирования. В домене bHLH и 2-4 экзонах наблюдалось минимальное число подобных замен (рис. 4). Это может указывать на действие движущего отбора на первый экзон, и стабилизирующего – на домен bHLH. По гену *ICE1* несинонимичный полиморфизм в целом распределен более равномерно (рис. 4). Домен bHLH имеет низкий уровень несинонимичного полиморфизма, однако высокий уровень «молчащего» полиморфизма ( $\pi_{sil}$ ) в обоих гомологах, то есть отбор препятствовал аминокислотным заменам в этой части белка. Это также говорит о древнем происхождении и высокой функциональной значимости домена.

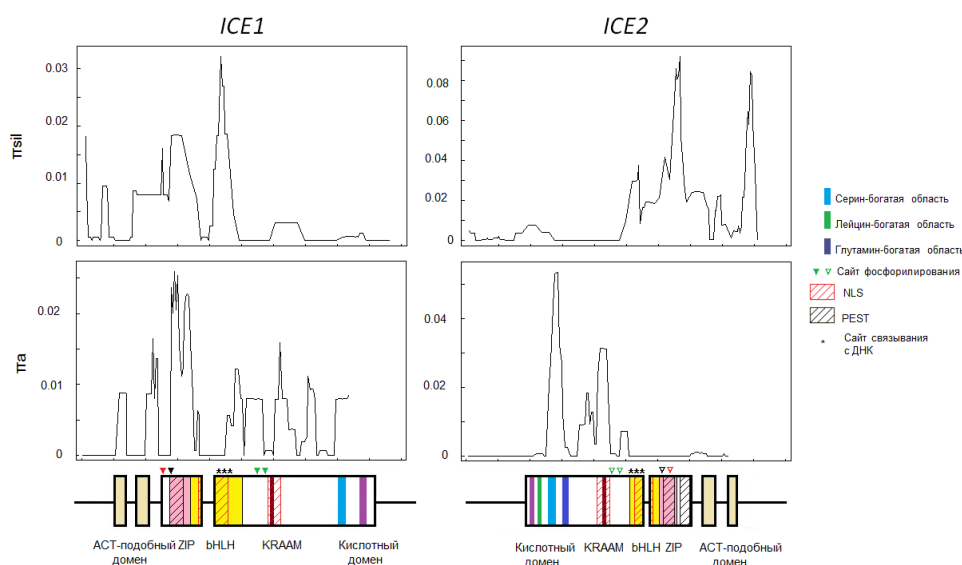


Рис. 4. Распределение «молчащего» ( $\pi_{sil}$ ), несинонимичного ( $\pi_a$ ) нуклеотидного полиморфизма и соотношения  $\pi_a/\pi_s$  по генам *ICE1* и *ICE2*. Анализ проведен по методу скользящего окна, длина окна 50 п.н., шаг 10 п.н. Позиции экзонов (прямоугольники), интронов (линии) и консервативных доменов обозначены внизу рисунка.

## 6. Эволюционные аспекты полиморфизма ортологов и паралогов генов *ICE* из *A.thaliana* и *A.lyrata*

Характер и направление действия отбора на гены *ICE* были изучены путем сравнения уровня полиморфизма в парах ортологов и паралогов генов из *A.thaliana* и *A.lyrata* (табл. 3). Отношение числа несинонимичных к числу синонимичных замен на сайт указывает на характер давления отбора на ген. Это соотношение для ортологов *ICE2* на порядок выше, чем для ортологов *ICE1*. Следовательно, аминокислотная последовательность *ICE2* претерпевает меньшее давление стабилизирующего отбора.

Таблица 3. Сравнение последовательностей ортологов и паралогов генов *ICE*

	$K_s$	$K_a$	$K_a/K_s$
<b>Ортологи</b>			
<i>A. thaliana ICE1</i> vs. <i>A. lyrata ICE1</i>	0,1829	0,0097	0,053
<i>A. thaliana ICE2</i> vs. <i>A. lyrata ICE2</i>	0,0888	0,0449	0,506
<b>Паралоги</b>			
<i>A. thaliana ICE1</i> vs. <i>A. thaliana ICE2</i>	0,5697	0,1868	0,328
<i>A. lyrata ICE1</i> vs. <i>A. lyrata ICE2</i>	0,5997	0,1576	0,263

Между парами паралогов соотношения  $K_a/K_s$  практически не различаются. Для выявления участков, которые отвечают за структурную и функциональную дивергенцию генов *ICE1* и *ICE2*, мы проанализировали последовательности паралогов из *A.thaliana* (рис. 5). Был выявлен ряд пиков отношения  $K_a/K_s$ , в том числе и в специфичных для *ICE2* доменах, что говорит об их функциональной значимости. Таким образом, движущий отбор привел к структурной дивергенции генов *ICE*.

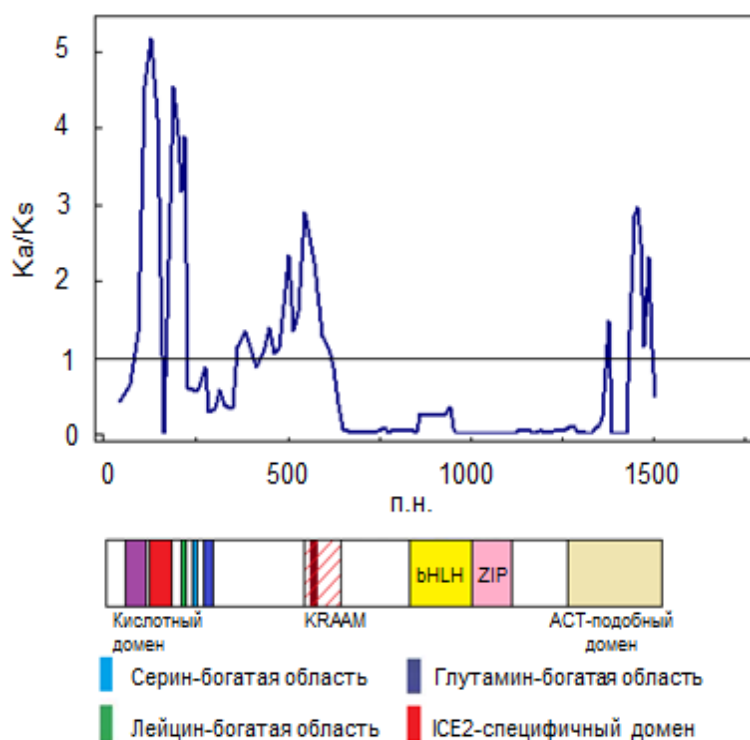


Рис. 5. Распределение значений  $\omega$  по кодирующей области паралогов *A. thaliana ICE1* и *ICE2*. Анализ проведен по методу скользящего окна, длина окна 50 п.н., шаг 10 п.н. Позиции белковых доменов обозначены внизу рисунка.

## 7. Применение тестов на нейтральность молекулярной эволюции для оценки действия отбора на различные участки генов *ICE*

Для установления того, воздействовал ли отбор на данную кодирующую последовательность после расхождения двух видов, был использован ряд тестов: тест МакДональда-Крейтмана, индекс нейтральности, тест МакДональда на гетерогенность, тест Таджимы. Установлено, что на последовательность гена *ICE1* действовал сильный стабилизирующий отбор. Различные типы отбора могли действовать на участки гена *ICE2*: стабилизирующий на 5'-НТР и домен bHLH, балансирующий на АСТ-подобный домен, домен ZIP, область 953-го нуклеотида, а также 3'-НТР.

## 8. Изучение функции гена *ICE2* с использованием трансгенных растений

### Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на фенотип трансгенных растений.

Трансгенные растения линий D7 и D14, экспрессирующие ген *ICE2* в десятки раз выше (рис. 6А), чем растения дикого типа (ДТ), имели замедленное развитие (рис. 6Б), а также изменения на ультраструктурном уровне. На листьях трансгенных растений наблюдалась значительная доля недоразвитых устьиц, расположенных в кластерах (рис. 6В), что подтверждает роль гена в контроле развития устьиц. Чашечный тест на выживаемость после замораживания показал, что почти 100% трансгенных растений выживает, выживаемость дикого типа меньше 40% (рис. 6Г). Отметим, что только апикальные части трансгенных растений были способны выжить после замораживания.

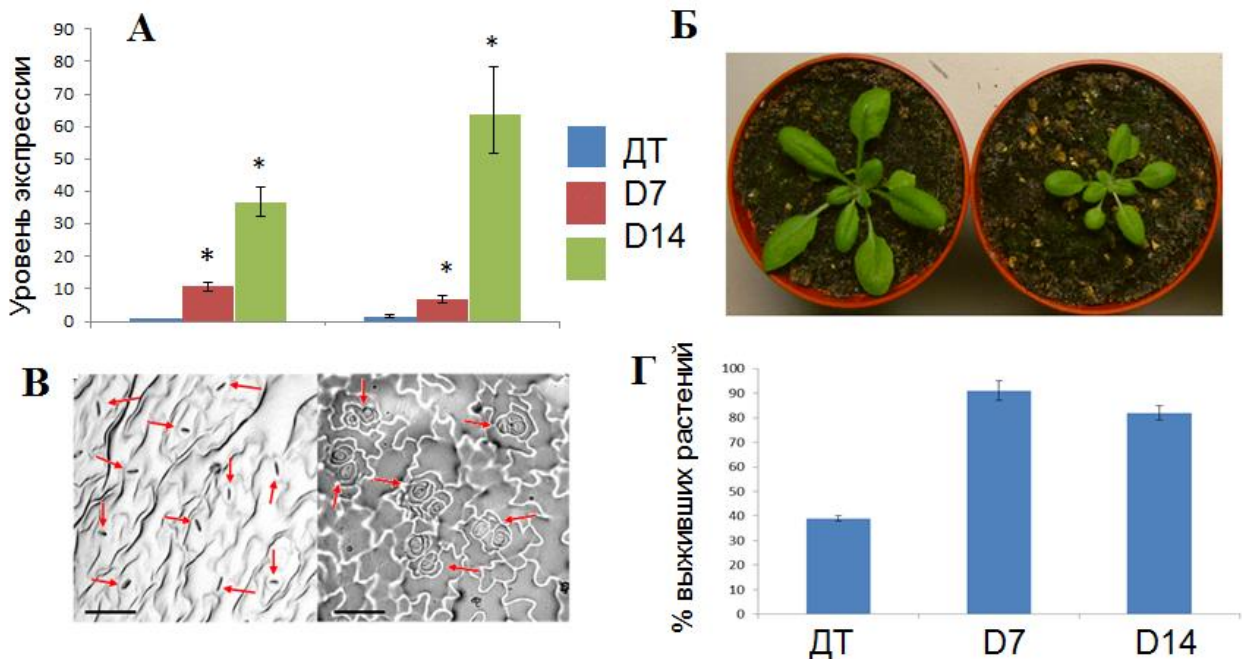


Рис. 6. Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на фенотип трансгенных растений.

(А) Анализ экспрессии гена *ICE2*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ. Здесь и на рис. 7 – 9 значения представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка двух биологических повторностей. \* выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии ДТ (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

(Б) Задержка роста трансгенных растений (справа) по сравнению с ДТ. (В) СЭМ нижней поверхности листьев. Стрелками выделены нормальные устьица (ДТ) и недоразвитые устьица (D14). Бар = 30 мкм.

(Г) Выживаемость растений после замораживания. Значения представлены в виде среднего двух биологических повторностей ± стандартная ошибка.

**Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на экспрессию генов регулона ответа на холод.** Для характеристики роли гена *ICE2* в генной сети ответа на холод был проведен анализ экспрессии генов холодового ответа. Так как меристемы побегов выживают после холодового воздействия, несмотря на гибель листьев, было использовано два вида тканей для анализа. Для изучения роли *ICE2* в контроле CBF-зависимого пути ответа на холод изучена экспрессия генов *CBF1-3* и их генов-мишеней *COR* (*COR15a*, *COR47*, *COR78*) через определенные промежутки времени после начала стресса. Выяснилось, что экспрессия гена *CBF1* выше в листьях и апексах трансгенных растений после 6 ч акклиматизации, а *CBF3* – только в апексах. Накопление транскриптов мишеней *CBF* генов *COR* максимально в апексах трансгенных растений после 24 ч акклиматизации (рис. 7). Полученные данные говорят о том, что несмотря на то, что *ICE2* активирует ген *CBF1* в листьях и меристемах, только в меристемах гены *COR* активируются максимально, возможно вследствие повышенной активации экспрессии *CBF3* или вследствие наличия дополнительных факторов.

Для изучения роли *ICE2* в работе АБК-зависимого пути ответа на холод были выбраны гены метаболизма АБК и контролируемые фитогормоном гены регулона *AREB/ABF* и ген *ADH*. За холод-индуцируемый синтез АБК в меристеме отвечает ген *NCED3*, а экспрессия *ABA1* и *CYP707A2* повышается при низкотемпературном стрессе в листьях и меристемах (Baron et al., 2012). Гены *RD29B* и *RAB18*, кодирующие дегидрины (Thomashow, 1999), и ген алкогольдегидрогеназы *ADH* (Jarillo et al., 1993; de Bruxelles et al., 1996) активируются АБК, осмотическим и низкотемпературным стрессами и участвуют в развитии устойчивости. Установлено, что экспрессия гена биосинтеза АБК *NCED3* повышается в апексах трансгенных растений под действием холода. Экспрессия трех генов, контролируемых этим гормоном, максимальна в апексах после акклиматизации (рис. 8). Характер активации транскрипции АБК-индуцируемых генов в трансгенных растениях под действием холода соответствует наблюдаемой экспрессии генов синтеза АБК и указывает на их участие в повышенной устойчивости меристем к холоду.

Что интересно, именно апексы трансгенных растений оказались устойчивы к холоду, несмотря на эктопический характер экспрессии *ICE2*. Недавно было установлено, что субъединицы медиаторного комплекса MED участвуют в контроле экспрессии генов *COR* путем привлечения хроматин-ремоделирующего комплекса и РНК-полимеразы II к проморам генов *COR* (Hemsley et al., 2014). Мы показали, что гены *MED16* и *MED2* экспрессируются на повышенном уровне в апексе как ДТ, так и трансгенных линий, а экспрессия гена *MED14* повышается в апексе под действием холода (рис. 9). Таким образом, *ICE2* контролирует адаптацию апексов к холоду путем регуляции экспрессии генов регулона *CBF* и генов ответа на холод, регулируемых АБК, а устойчивость к холоду апикальных частей побега является результатом повышенного уровня транскрипции не только гена *ICE2*, но и генов субъединиц медиаторного комплекса.

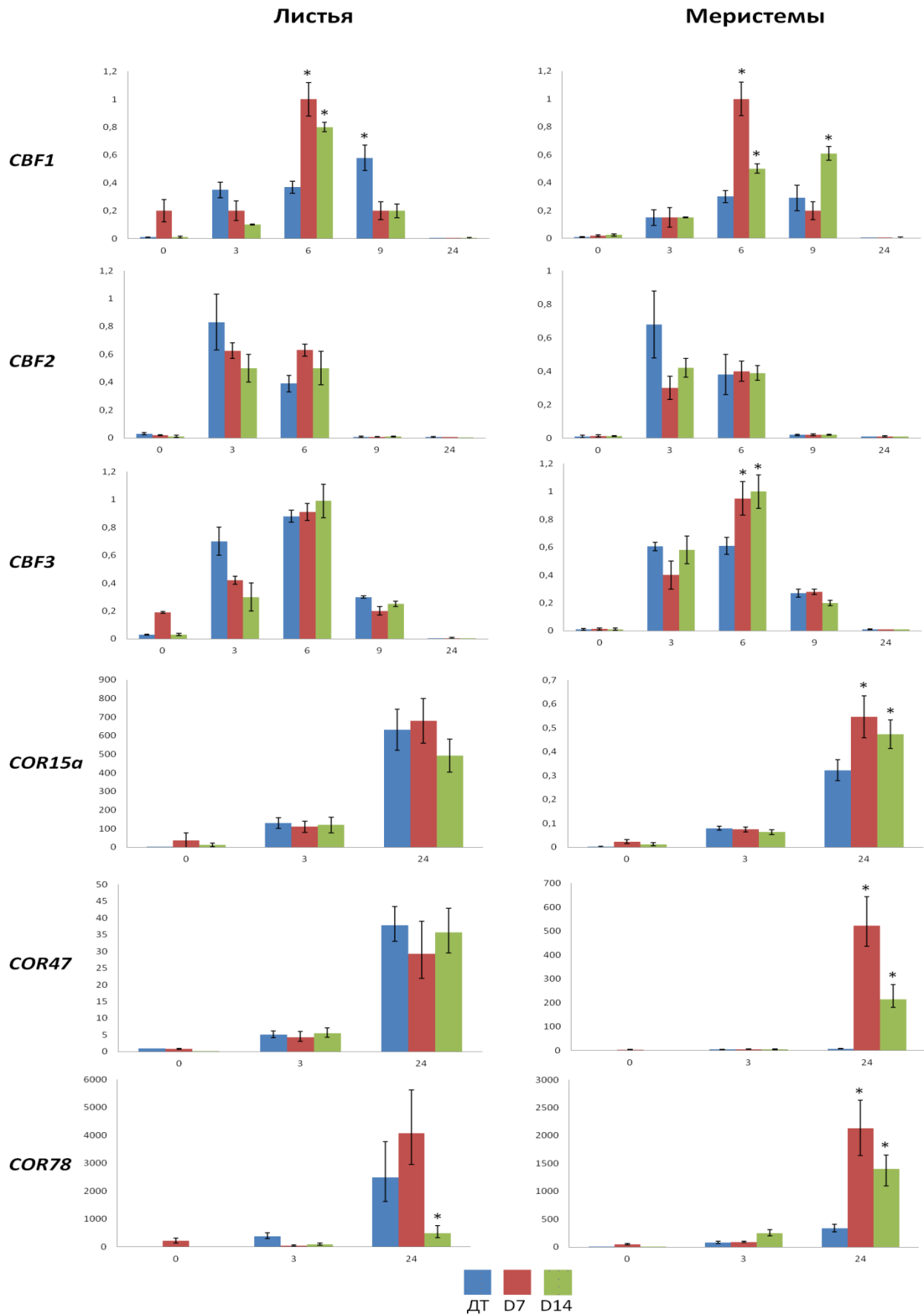


Рис. 7. Влияние 4<sup>0</sup>С на уровень экспрессии генов регулона *CBF* в 14-дневных проростках *A.thaliana*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч).

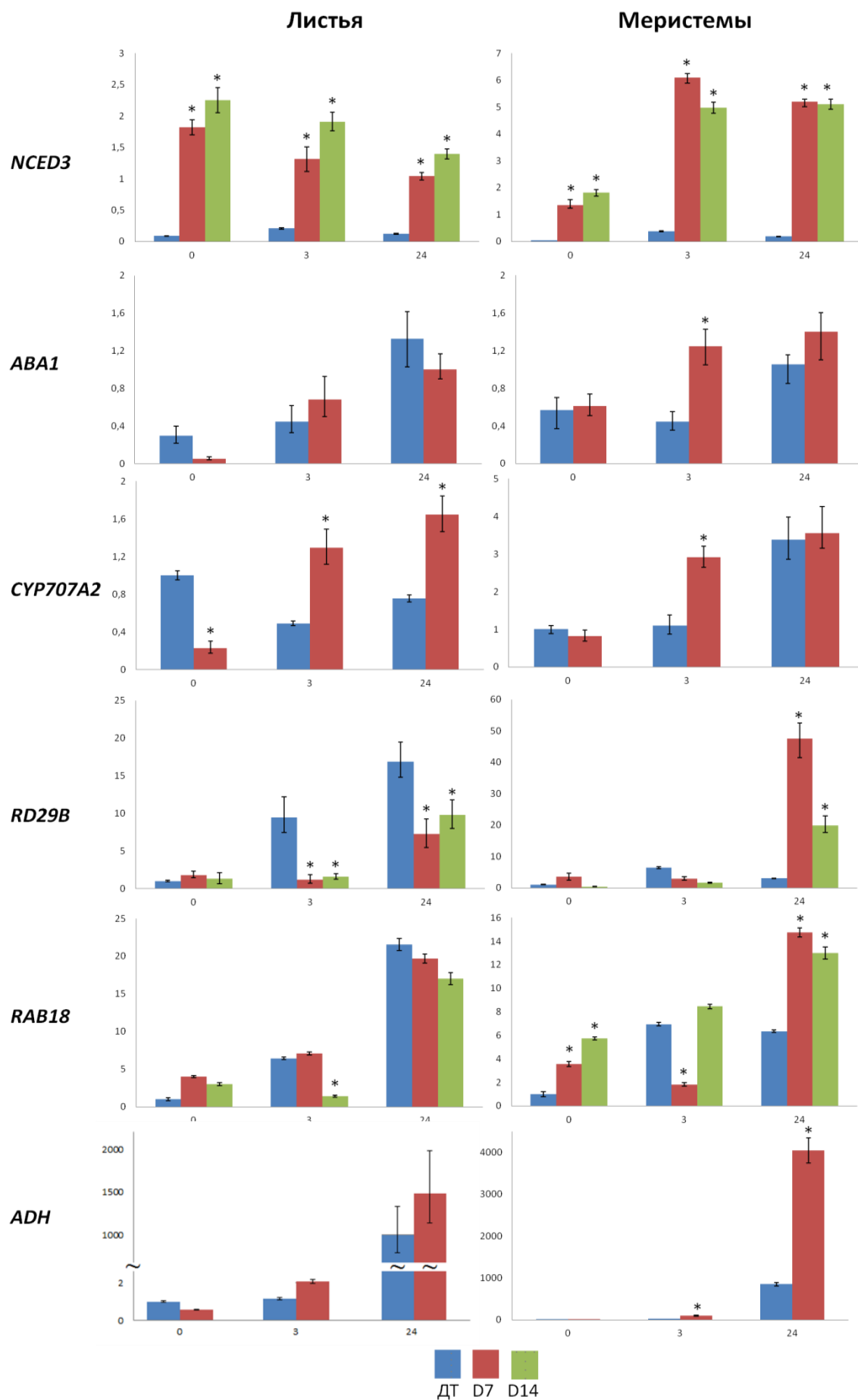


Рис. 8. Влияние 4°C на уровень экспрессии генов метаболизма АБК и АБК-зависимых генов устойчивости в 14-дневных проростках *A.thaliana*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч).

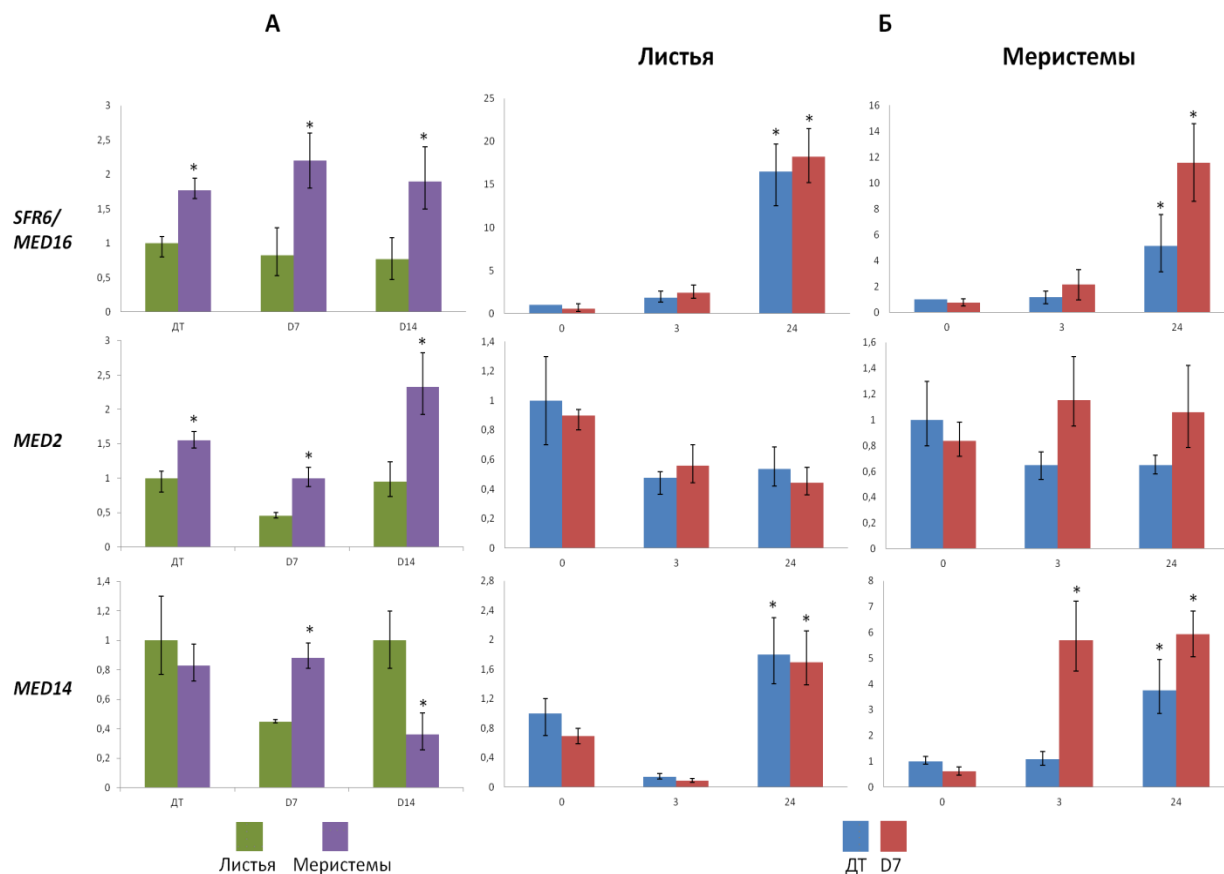


Рис. 9. Анализ экспрессии генов субъединиц медиаторного комплекса (А) при нормальных условиях; (Б) при 4°C. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч).

## 9. Роль гена *ICE2* в адаптации к условиям северной границы ареала *A. thaliana*

Чтобы установить, участвует ли ген *ICE2* в механизмах адаптации *A. thaliana* к различным климатическим условиям, мы поставили задачу определить, какие гены отвечают за повышенную устойчивость к холоду ранее не изученных северных рас *A. thaliana*. Объектом послужили природных 6 популяций из Республики Карелия. В качестве контроля были использованы растения расы Dj-M (Франция) и расы Cvi-0 с тропических Островов Зеленого Мыса. Выяснилось, что ген *ICE2* и гены регулона *CBF* экспрессируются на повышенном уровне в северных расах (рис. 10), а ген *ICE2* и АБК-зависимые гены экспрессируются на одинаковом уровне. Это служит дополнительным подтверждением роли *ICE2* в адаптации к холоду.

## 10. Изучение связи экспрессии *ICE2* с регуляцией времени зацветания

Обнаружено, что устойчивые к холоду трансгенные линии и расы из северных областей зацветают позднее, чем линии ДТ из умеренной зоны. Ранее было показано, что гены *SOC1*, *CBF1-3* и *FLC* опосредуют связь регуляции времени зацветания и ответа на холод (Seo et al., 2009). Для изучения возможной связи гена *ICE2* с регуляцией цветения была изучена экспрессия генов цветения в позно- и раноцветущих природных популяциях *A. thaliana* и трансгенных линиях. Относительная экспрессия гена-активатора цветения *FLC* коррелирует с уровнем экспрессии *ICE2* только в растениях северных рас. Экспрессия гена-репрессора цветения *SOC1* отрицательно коррелирует с *ICE2* во всех изученных линиях (рис. 11).



Следовательно, *ICE2* может участвовать в негативной регуляции перехода растений на репродуктивную стадию развития, регулируя транскрипцию *SOC1*.

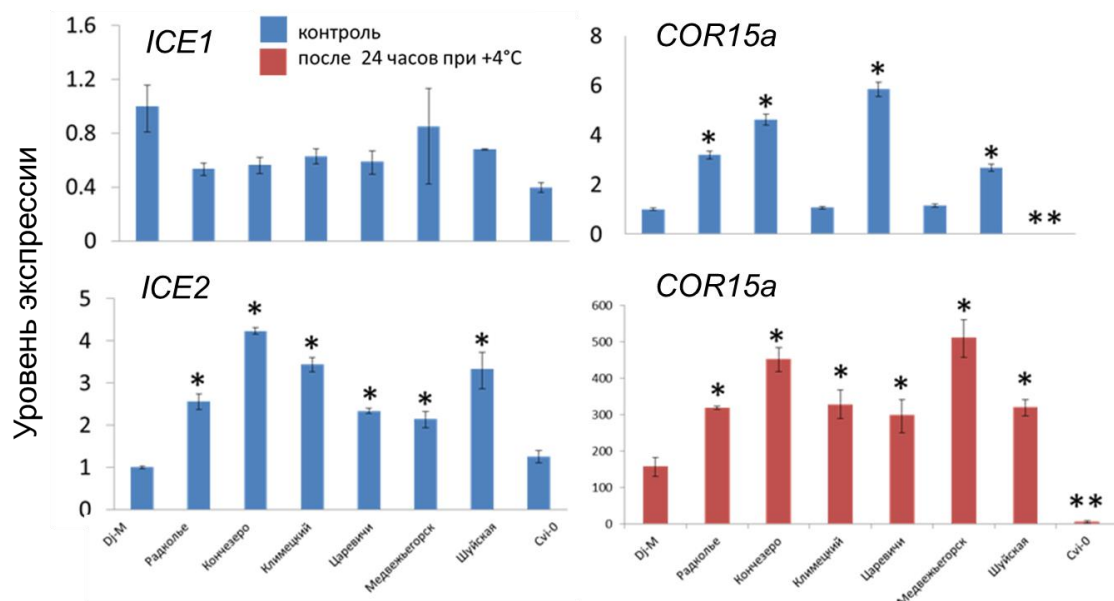


Рис. 10. Относительный уровень экспрессии генов ответа на холод в различных расах *A.thaliana*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена. За единицу принят уровень транскрипции гена в Dj-M без холодного воздействия. Здесь и на рис. 11 \* и \*\*выделены статистически достоверно отличные от Dj-M группы (однофакторный дисперсионный анализ, уровень значимости 1%).

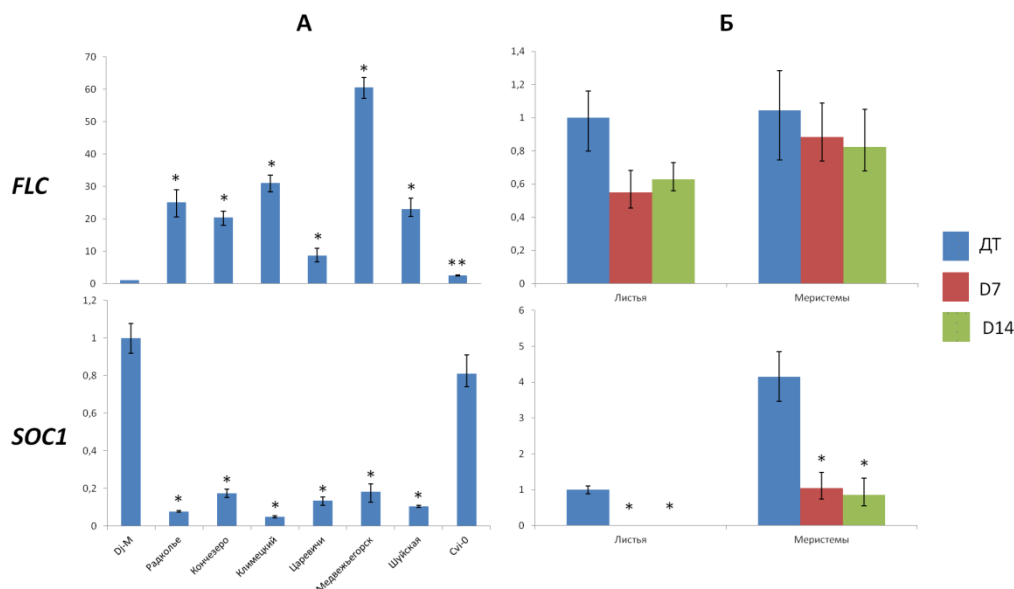


Рис. 11. Относительный уровень экспрессии генов, контролирующих цветение: А – в различных расах *A.thaliana*, Б– в трансгенных линиях. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена. За единицу принят: А - уровень транскрипции гена в Dj-M без холодного воздействия, Б – уровень транскрипции гена в ДТ (Columbia).

## Заключение

Изучение роли гена *ICE2* позволило подтвердить в нашей работе его роль в холодовом ответе (Fursova et al., 2009) и развитии устьиц (Kanaoka et al., 2008). Принципиально новым является доказательство роли гена *ICE2* в контроле устойчивости к холоду апикальной меристемы побега путем регуляции генов регулона *CBF* (*CBF1*, *CBF3*, *COR15a*, *COR47*, *COR78*), синтеза АБК (*NCED3*) и АБК-индуцируемых генов, кодирующих дегидрины и алкогольдегидрогеназу (*RD29B*, *RAB18*, *ADH*), достигнутое с помощью физиологического и молекулярно-генетического анализа трансгенных растений. Мы также установили, что в защите меристем от гипотермии участвуют также кофакторы транскрипционных факторов семейства *CBF* (*SFR6*, *MED2*, *MED14*).

На основании изучения структуры промоторной области также высказано предположение о роли гена в ответе на биотические стрессовые факторы. Следовательно, ген *ICE2* может потенциально быть использован для создания новых трансгенных культур, обладающих одновременно устойчивостью к холоду и патогенам.

Кроме того, нами впервые выявлено участие гена в репрессии цветения путем подавления экспрессии активатора цветения, гена *SOC1*. Эти данные указывают на возможное участие *ICE2* в негативной регуляции цветения *A. thaliana* в условиях северного ареала. Ранее основная роль в позднем зацветании северных рас *A. thaliana* отводилась генам *FRI* (Stinchcombe et al. 2004) и *FLC* (Stinchcombe et al., 2005; Shindo et al., 2005), контролирующим потребность растений в яровизации.

Мы также предложили возможную модель происхождения гена *ICE2*. Установлено, что *ICE2* возник около 18 миллионов лет назад в результате сегментной дупликации у одного из предковых современных Капустных. На основании анализа внутривидового полиморфизма и межвидовой дивергенции генов *ICE1* и *ICE2* было установлено, что на *ICE1* действовал стабилизирующий отбор, что отразилось как в низком уровне полиморфизма, так и в

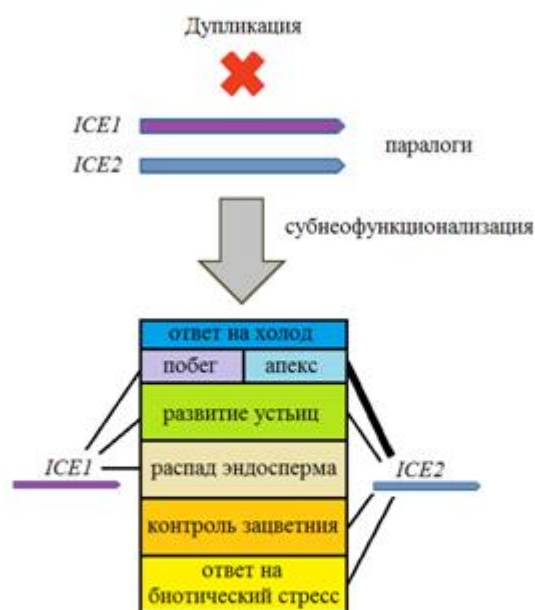


Рис. 12. Предполагаемая модель эволюции генов *ICE* и выполняемые ими функции.

отсутствии клинальной изменчивости по уровню разнообразия. На более молодой в эволюционном отношении ген *ICE2* давление стабилизирующего отбора было минимальным, а движущий, стабилизирующий и балансирующий отбор действовали на разные участки гена. Это привело к структурной и функциональной дивергенции генов *ICE1* и *ICE2* *A. thaliana*: изменению структуры промотора и кодирующей части гена, появлению новых консервативных белковых доменов и, как следствие, новых функций гена или специализации функций

предкового гена, т.е. ее разделению между дочерними копиями. Подобная схема согласуется с гипотезой субнеофункционализации (He and Zhang, 2005). Кроме того, различное давление отбора на *ICE2* в различных климатических зонах привело и к значительной клинальной изменчивости по уровню внутривидового полиморфизма: расы из южных регионов испытывали пониженное давление стабилизирующего отбора. Как следствие, важную роль в устойчивости растений северных рас из Карелии может играть ген *ICE2* и регулируемые им гены регулона *CBF*. Удивительным представляется отсутствие подобного клина по внутривидовой изменчивости гена *ICE1*, известного как регулятор ответа на гипотермию (Chinnusamy et al., 2003). Возможно, регуляция акклиматизации не является основной функцией гена. Таким образом, мы предполагаем, что именно *ICE2* может играть более важную роль в регуляции холодового ответа.

Изменения в структуре промотора, кодирующей области гена и возможная коэволюция дополнительных факторов вместе привели к возникновению новых функций *ICE2* на организменном уровне (рис. 12), а, значит, к появлению новых адаптаций растений семейства Капустные к меняющимся условиям окружающей среды в ходе похолодания, характерного для периода распространения предковых Капустных, что и позволило им занять образующиеся в ходе геологических процессов новые ниши.

### Выводы

1. По данным филогенетического анализа, ген *ICE2* возник около 18 миллионов лет назад в результате сегментной дупликации у одного из видов древних Brassicaceae и эволюционировал в соответствии с моделью субнеофункционализации;
2. Промоторный и кодирующий участки гена *ICE2* *A. thaliana* значительно отличаются от *ICE1*, что обуславливает изменение особенности экспрессии *ICE2* и появление новых консервативных доменов в белке.
3. Ген *ICE2* участвует в адаптации растений к холоду путем регуляции экспрессии генов регулона *CBF* (*CBF1*, *CBF3*, *COR15a*, *COR47*, *COR78*), а также генов ответа на холод, регулируемых абсцизовой кислотой (*RD29B*, *RAB18*, *ADH*);
4. Ген *ICE2* защищает от холода апикальные части побега, что является результатом более высокого уровня транскрипции в апексах самого гена *ICE2* и генов *SFR6*, *MED2*, *MED14*, продукты которых являются кофакторами белков *CBF*;
5. Выявлена клинальная изменчивость по уровню внутривидового нуклеотидного полиморфизма гена *ICE2* (но не *ICE1*): последовательность гена из растений южных рас по сравнению с северными расами *A. thaliana* испытывала пониженное давление стабилизирующего отбора;

6. В растениях северных рас из Карелии выявлено повышение уровня транскрипции гена *ICE2* (но не *ICE1*) по сравнению с расами южных и умеренных широт. Эти результаты вместе с данными по клинальной изменчивости гена *ICE2*, свидетельствуют в пользу того, что в условиях северного ареала ген *ICE2* играет более важную роль в контроле адаптации растений *A. thaliana* к холоду по сравнению с *ICE1*;

7. Выявлена связь между уровнем транскрипции гена *ICE2* и гена *SOC1*, контролирующего время зацветания растений *A. thaliana*, что указывает на возможное участие *ICE2* в негативной регуляции перехода растений на репродуктивную стадию развития в условиях северного ареала.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. Курбидова, А.С. Генетический контроль устойчивости растений к холоду / А.С. Курбидова, М.Г. Новокрещёнова // Генетика. - 2011. - Т. 47, №5. - С. 735-751.
2. Курбидова А.С. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* к экстремальным условиям северной границы ареала / А.С. Курбидова, М.В. Зарецкая, А.Д. Солтабаева, М.Г. Новокрещёнова, Е.В. Куприянова, О.М. Федоренко, Т.А. Ежова // Генетика. - 2013. Т. 49, №18. С. 943-952.
3. Kurbidova, A. *Arabidopsis thaliana ICE2* gene: Phylogeny, structural evolution and functional diversification from *ICE1* / A. Kurbidova, T. Ezhova, M. Novokreshchenova // Plant Science. - 2014. V. 229. P. 10-22.
4. Kurbidova, A. The *ICE* genes in *Arabidopsis thaliana*: clinal variation in DNA polymorphism levels and sequence diversification / A. Kurbidova, M. Novokreshchenova, T. Ezhova // Biologia plantarum. – 2015. V. 59(2). doi: 10.1007/s10535-015-0497-y.

#### Тезисов докладов и материалов конференций

1. Novokreshchenova, M.G. The study of *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing the cold resistance gene *ICE2*. / M.G. Novokreshchenova, A.S. Kurbidova, V.A. Tarasov // 3rd International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants (ISEPEP3), Tsukuba, Japan, 24 -28 August 2009, P. 22.
2. Курбидова, А.С. Изучение роли гена *Arabidopsis thaliana ICE2* в развитии холодового ответа / А.С. Курбидова // Сборник тезисов XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2010», серия Биология, подсекция «Генетика», Москва, Россия, 12 — 15 апреля 2010, С. 87.
3. Kurbidova, A.S. Possible role of ABA in initiation of stomata development in *Arabidopsis thaliana* / A.S. Kurbidova, M.G. Novokreshchenova // INPAS3, Valencia, Spain. 2010, P.14.
4. Novokreshchenova, M.G. Overexpression of *Arabidopsis* transcription factor *AtICE2* enhance the expression of genes involved in the ABA-dependent cold response / M.G. Novokreshchenova, A.S. Kurbidova, V.A. Tarasov // The FEBS Journal. 2010. V.277. Supplement s1. Abstracts of the 35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden, 26 June - 1 July 2010, P. 154.
5. Курбидова, А.С., Изучение специфики регуляции холодового ответа в трансгенных растениях суперэкспрессирующих транскрипционный фактор *ICE2 Arabidopsis thaliana* /

**А.С. Курбидева**, М.Г. Новокрещенова // Материалы II Всероссийской школы-конференции молодых ученых Уфимского научного центра РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии, 27-29 сентября 2011. Специальный выпуск журнала "Биомика" Т. 1 № 2 2011, С. 67.

6. **Курбидева, А.С.** Особенности экспрессии генов семейства *ICE*, контролирующей устойчивость к холоду, в растениях *Arabidopsis thaliana* из северных популяций Карелии / **А.С. Курбидева** // Сборник тезисов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», серия Биология, подсекция «Генетика», Москва, Россия, 9 – 13 апреля 2012, С. 77-78.

7. Зарецкая, М. В. Генетические основы адаптации: время цветения и устойчивость к холоду у *Arabidopsis thaliana* (L.) / М.В.Зарецкая, **А.С.Курбидева**, М.Г. Новокрещенова, Е.В. Куприянова, Т.А. Ежова, О.М. Федоренко // Материалы всероссийской молодежной конференции "Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии». Уфа, Россия, 24-28 сентября 2012, С. 59-65.

8. **Курбидева, А.С.** К вопросу адаптации *Arabidopsis thaliana* на северной границе ареала обитания / **А.С. Курбидева**, М.В. Зарецкая, Е.В. Куприянова, М.Г. Новокрещенова // Сборник тезисов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань, Россия, 22-24 ноября 2012, С. 83.

9. **Kurbidaeva, A.** Flower transition and cold response genetics in *Arabidopsis thaliana* Karelian populations / **A. Kurbidaeva**, M. Zaretskaya, M. Novokreshchenova, E. Kupriyanova // International Conference "Plant Genetics and Breeding Technologies" Abstract Book, Vienna, Austria, 18-20 February 2013.

10. **Kurbidaeva, A.S.** Exploration of the origin and evolution of *Arabidopsis thaliana ICE2* gene / **A.S. Kurbidaeva**, M.G. Novokreshchenova, E.V. Kupriyanova, T.A. Ezhova // Plant Genome Evolution Abstract Book, Amsterdam, Netherlands, 8–10 September 2013, P. 97.

11. **Kurbidaeva, A.S.** DNA Polymorphism and divergence at the *ICE2* Gene in *Arabidopsis thaliana*: Different selection pressures acting along clines and gene sequence / **A.S. Kurbidaeva**, M.G. Novokreshchenova, E.V. Kupriyanova, T.A. Ezhova // Plant Genome Evolution Abstract Book, Amsterdam, Netherlands, 8–10 September 2013, P. 90.

## **Благодарности**

Выражаю искреннюю признательность научному руководителю профессору Т.А.Ежовой за чуткое руководство и поддержку на всех этапах выполнения работы. От души благодарю с.н.с. М.Г.Новокрещенову за неоценимую помощь и переданные мне знания и навыки. Выражаю глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории генетики растений кафедры генетики МГУ за сотрудничество и теплую рабочую обстановку. Огромная благодарность академику С.В. Шестакову и профессору В.А. Тарасову за идею использования трансгенных линий для изучения функции гена *ICE2*, а также аспирантам и сотрудникам ИОГен РАН О.В.Фурсовой, Г.В.Погорелко и О.А.Огарковой за получение трансгенных линий. Благодарю сотрудников КарНЦ РАН О.М.Федоренко и М.В.Грицких за предоставление уникальных природных популяций *A.thaliana*, профессора К. Шмитц-Линневебера за предоставленную возможность освоения новых методов в лаборатории молекулярной генетики Берлинского Университета имени Гумбольдтов.