

Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова

На правах рукописи

Курбидаева Амина Султановна

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

Специальность 03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Воздействие низких температур на растение.....	8
1.2. Ответ растения на холод.....	10
1.2.1. Механизмы восприятия и передачи холодового сигнала.....	11
1.2.2. Транскрипционные факторы, регулирующие ответ на холод.....	12
1.2.3. Физиологические перестройки в результате акклиматизации.....	18
1.2.4. Роль растительных гормонов и метаболитов в ответе на холод.....	20
1.2.5. Взаимосвязь между регуляцией ответа на холод и времени зацветания... ..	23
1.3. Семейство ICE: структурные особенности и функции.....	23
1.3.1. Структурные особенности.....	23
1.3.2. Функции.....	25
1.4. Внутривидовая изменчивость по устойчивости к холоду и ее генетические основы.....	27
1.4.1. Необходимость изучения природного разнообразия растений.....	27
1.4.2. Генетические ресурсы <i>A. thaliana</i>	28
1.4.3. Методы изучения адаптаций к климату.....	31
1.4.4. Внутривидовой полиморфизм по устойчивости к холоду <i>A. thaliana</i> и его генетические основы.....	38
1.4.4.1. Клиальная изменчивость по устойчивости к холоду.....	39
1.4.4.2. Роль генов регулона <i>CBF</i> в формировании внутривидовых различий по устойчивости к холоду <i>A. thaliana</i>	40
1.5. Заключение.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Растительный материал и условия выращивания.....	45
2.2. Получение гомозиготных линий трансгенных растений с суперэкспрессией гена <i>ICE2</i>.....	45
2.3. Физиологический тест на устойчивость к холоду.....	46
2.4. Сканирующая электронная микроскопия.....	47
2.5. Молекулярные методы.....	47
2.6. Методы биоинформатики.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
3.1. Анализ филогении гена <i>ICE2</i>.....	58
3.2. Анализ геномной микросинтезии участков хромосом 1 и 3 <i>A. thaliana</i>.....	61
3.3. Структурные особенности генов <i>ICE1</i> и <i>ICE2</i>.....	61
3.4. Биоинформатический анализ промоторных областей генов <i>ICE1</i> и <i>ICE2</i> и сравнение характера их экспрессии.....	64
3.5. Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов <i>ICE1</i> и <i>ICE2</i> среди рас <i>A. thaliana</i> из разных широт	67
3.5.1. Нуклеотидный полиморфизм по генам <i>ICE1</i> и <i>ICE2</i> в контексте географического происхождения рас.....	68

3.5.2. Распределение внутривидового полиморфизма по последовательности генов <i>ICE</i> и связь с доменной структурой продукта гена.....	73
3.5.3. Эволюционные аспекты полиморфизма ортологов и паралогов генов <i>ICE</i> из <i>A.thaliana</i> и <i>A.lyrata</i>	75
3.5.4. Применение тестов на нейтральность молекулярной эволюции для оценки действия отбора на различные участки генов <i>ICE</i>	77
3.6. Изучение функции гена <i>ICE2</i> с использованием трансгенных растений...	80
3.6.1. Влияние суперэкспрессии гена <i>ICE2</i> на фенотип трансгенных растений...	81
3.6.2. Реакция трансгенных растений на холодовой стресс.....	83
3.6.3. Влияние суперэкспрессии гена <i>ICE2</i> на экспрессию генов регулона <i>CBF</i> /АБК-независимого пути ответа на холод.....	85
3.6.4. Влияние суперэкспрессии гена <i>ICE2</i> на АБК-зависимый путь ответа на холод/экспрессию генов метаболизма АБК и регулона <i>AREB</i> / <i>ABF</i>	88
3.7. Роль гена <i>ICE2</i> в адаптации к условиям северной границы ареала обитания <i>A. thaliana</i>.....	91
3.8. Изучение связи экспрессии <i>ICE2</i> с регуляцией времени зацветания.....	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	97
4.1. Роль гена <i>ICE2</i> в устойчивости к холоду апикальной меристемы побега..	97
4.2. Возникновение гена <i>ICE2</i> в результате дупликации и его структурная и функциональная дивергенция.....	99
4.3. Филогения семейства Капустные и роль гена <i>ICE2</i> в появлении адаптаций и дивергенции таксонов.....	102
4.4. Внутривидовой полиморфизм и межвидовая дивергенция последовательностей генов <i>ICE1</i> и <i>ICE2</i>	104
4.5. Возможная модель эволюции генов <i>ICE</i>	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	140

ВВЕДЕНИЕ

Холод является одним из основных факторов окружающей среды, ограничивающим ареалы обитания растений и отрицательно влияющих на продуктивность хозяйственно ценных культур. В ходе эволюции растения выработали эффективные физиолого-биохимические способы ответа на губительное влияние низкотемпературного стресса. Стрессовый сигнал воспринимается клеточными рецепторами и передается по цепи мессенджеров, приводя в конечном итоге к активации генов стрессового ответа. Продукты этих генов приводят к немедленному ответу на стресс либо к адаптации растения. Немедленный ответ может привести и к ингибированию роста или клеточной смерти (Mahajan and Tuteja, 2005), адаптация же является основой устойчивости.

В 1985 году на шпинате впервые было показано, что под действием холода происходит изменение экспрессии некоторых генов (Guy et al., 1985). Затем было установлено, что в ответ на пониженные температуры происходит ряд процессов, известных как холодовая адаптация, или акклиматизация (Guy and Haskell, 1988). Как в течение года, так и в течение суток растения умеренных регионов подвергаются воздействию колебаний температур. В теплое время года их способность противостоять холоду невысока, однако с приходом осени устойчивость к холоду многих растений повышается. Пониженные температуры включают каскады генов, приводящих к накоплению метаболитов и структурных белков, позволяющих избежать повреждений клеток.

Ключевыми вопросами генетики устойчивости к холоду являются идентификация генов, вовлеченных в процесс акклиматизации, исследование их функций, способов восприятия и передачи сигнала. Знание механизмов адаптации и устойчивости к холоду имеет не только фундаментальное, но и потенциальное практическое значение. Низкие температуры являются основным фактором, ограничивающим области культивирования теплолюбивых растений, а также периодически приводящим к потере урожая при неожиданном похолодании. Создание трансгенных растений, несущих несвойственные данному виду гены либо суперэкспрессирующиеся собственные «полезные» гены, успешно используется для увеличения хозяйственной ценности культур.

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). Эти гены кодируют белки, которые могут быть поделены на три группы: сенсоры и передатчики сигнала, транскрипционные факторы, протекторные белки. 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 идентифицированных на сегодняшний момент считаются регулон CBF/DREB1 (Shinozaki et al., 2003; Guy et al. 2008; Hua 2009; Thomashow, 2010), и AREB/ABF, индуцируемый абсцизовой кислотой (Choi et al., 2000). В состав регулона CBF/DREB1 входят гены транскрипционных факторов, являющихся мишенью гена *ICE1*, считавшегося главным регулятором холодового ответа у *A.thaliana* (Chinnusamy, Ohta et al. 2003, Lee, Henderson et al. 2005). Регулон CBF/DREB1 остается главным регулоном холодовой устойчивости, в него входят 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. 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 данной работы заключалась в изучении структуры гена *ICE2* и его роли в контроле устойчивости растений *A.thaliana* к холоду, сравнении внутри- и межвидового полиморфизма паралога *ICE2* и *ICE1* и анализе возможных путей эволюции *ICE2*. Были поставлены следующие **задачи**:

1. Филогенетический анализ белков *ICE1* и *ICE2* из разных видов растений;
2. Изучение структуры кодирующей и промоторной областей генов *ICE1* и *ICE2*;
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 CBF-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 климальной 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Воздействие низких температур на растение

Для каждого вида растений существует свой диапазон оптимальных температур, и отклонение от этого оптимума является стрессом для организма. Повреждающее воздействие холодового стресса различно при действии: (1) низких положительных температур и (2) температур ниже 0⁰С.

При положительных субоптимальных температурах (англ. Chilling – «охлаждение») в первую очередь повреждаются вакуолярные АТФазы (Kawamura and Uemura, 2014). Кроме того, мембранные липиды переходят из жидкой ламеллярной фазы (L α) в состояние геля (L β), что необратимо нарушает функции мембраны (Kawamura and Uemura, 2014). Снижение уровня ненасыщенности мембранных липидов повышает температуру, при которой происходит смена фаз и, следовательно, снижает текучесть мембран при низких температурах. Показано, что чувствительность растений к холоду коррелирует со степенью ненасыщенности тилакоидных мембран хлоропластов (Kawamura and Uemura, 2014). Фотосистемы хлоропластов подвергаются фотоиндуцированным повреждениям. Восстановление кислорода на ФС1 приводит к образованию реактивных форм кислорода (РФК): перекиси водорода H₂O₂, гидроксильного радикала -ОН, супероксидного аниона - O₂⁻, синглетного кислорода - ¹O₂, которые являются сильными окислителями разнообразных компонентов клетки (Креславский и др., 2012). Это происходит при увеличении скорости разложения воды и транспорта электронов в ходе световых реакций фотосинтеза. Световая стадия фотосинтеза проходит в мембранах тилакоидов, которые и становятся мишенью для повреждений (Moller et al., 2007). Нарушения ресинтеза белка D1 вследствие десатурации мембран приводят к фотоингибированию ФС2 (Argo et al., 1993). Происходят также нарушения процессов метаболизма, связанные с замедлением работы ферментов, закисление цитоплазмы (Kawamura and Uemura, 2014).

При падении температуры ниже 0⁰С (англ. Freezing – «замерзание») первичной мишенью становятся мембранные системы клетки (Steponkus., 1984). Образование льда в симпласте смертельно для клетки, в то время как лед в

апопласте может не приводить к гибели растения. Формирование кристаллов льда начинается в межклеточном пространстве, где концентрация солей ниже, следовательно, выше температура замерзания. Необходимо отметить, что лед образуется в симпласте по гомогенному типу, т.е. только при температурах, близких к -38.5 °С. Кристаллизация льда в апопласте происходит по гетерогенному типу, вокруг ядер кристаллизации (Franks, 1985). Так как химический потенциал льда меньше, чем водный, формирование внеклеточного льда приводит к выходу воды из клетки по градиенту химического потенциала. При -10°C более 90% воды выходит из клетки. Обезвоживание или комбинация обезвоживания и механического стресса, причиняемого кристаллами льда, приводит к тесному сближению ПМ с мембранами внутриклеточных органелл или дистальными участками ПМ, что вызывает формирование гексагональных структур из липидов (так называемая фаза НII) (Kawamura and Uemura, 2014). Затем, как правило, мембраны сливаются либо разрываются, приводя к необратимым клеточным повреждениям (Steponkus, 1984). Целостность органелл также нарушается, что приводит к потере компартментализации и ингибированию метаболических процессов (Tuteja, 2009). Некоторые авторы указывают на то, что именно механический стресс, а не обезвоживание, являются ведущей разрушительной силой при низкотемпературном стрессе (Yamazaki et al., 2008). Также происходит денатурация белков (Kawamura and Uemura, 2014).

Центральный процесс, поставляющий энергию для растения, фотосинтез, также подвергается негативному влиянию стресса. Основными мишенями являются поступление CO_2 , эффективность работы фотосистем, транспорт электронов, формирование РФК, содержание АТФ и НАДФН, активность фермента Рубиско (Tuteja, 2009). Растениям приходится поддерживать скорость фотосинтеза на необходимом уровне и вместе с тем не допускать дисбаланса энергии, ведущего к фотоокислительным повреждениям. Показано, что большинство генов многих компонентов фотосинтеза подвержены негативной регуляции в ходе развития холодого ответа (Savitch et al., 2001).

Холод и обезвоживание вызывают закрытие устьиц, что ведет к сокращению поступления CO_2 и к уменьшению скорости фотосинтеза. К сокращению

поступления CO_2 приводит также понижение проницаемости мезофилла, зависящей от активности аквапоринов в клеточных мембранах (Saibo et al., 2009).

Холодовой стресс влияет и на клеточный цикл. Экспрессия *CYCB1*, гена, участвующего в контроле клеточного цикла, индуцируется при длительном воздействии низких температур (Lee et al., 2009).

1.2 Ответ растения на холод

Растения используют три основные стратегии ответа на низкотемпературный стресс. Простейший способ, используемый многими травянистыми однолетниками, - это переживание холодного периода (зимы) в виде семян, корней или корневищ, погруженных в почву. Зимнее выживание древесных растений достигается с помощью механизма переохлаждения (англ. Supercooling). При температуре ниже 0°C внутриклеточная жидкость не замерзает, что достигается синтезом белков-антифризов (Аванов, 1990; Urrutia et al., 1992), флавоноидов и танинов (Kuwabara et al., 2013) или изоляцией внутриклеточного пространства от внеклеточного, где происходит формирование льда (Kuroda et al., 2003). Третья стратегия используется всеми видами растений, способных к акклиматизации. Стресс активирует ряд физиологических ответов на молекулярном уровне. Эти механизмы приводят к активации сигнальных путей и генов, кодирующих белки устойчивости. Физиологический ответ на холодовой стресс развивается в три этапа (рис. 1):

1) Восприятие и передача сигнала

Под действием холода в первую очередь активируются осмосенсоры, фосфатазы, вторичные мессенджеры (ионы Ca^{2+} , РФК, протеинкиназы).

2) Транскрипционный контроль

На этом этапе активируются семейства транскрипционных факторов (ТФ), которые индуцируют экспрессию генов-мишеней.

3) Физиологические перестройки

На заключительном этапе белки, кодируемые индуцированными в ходе второго этапа генами, вызывают ряд морфологических, структурных и физиолого-биохимических механизмов, повышающих устойчивость растения к стрессу.

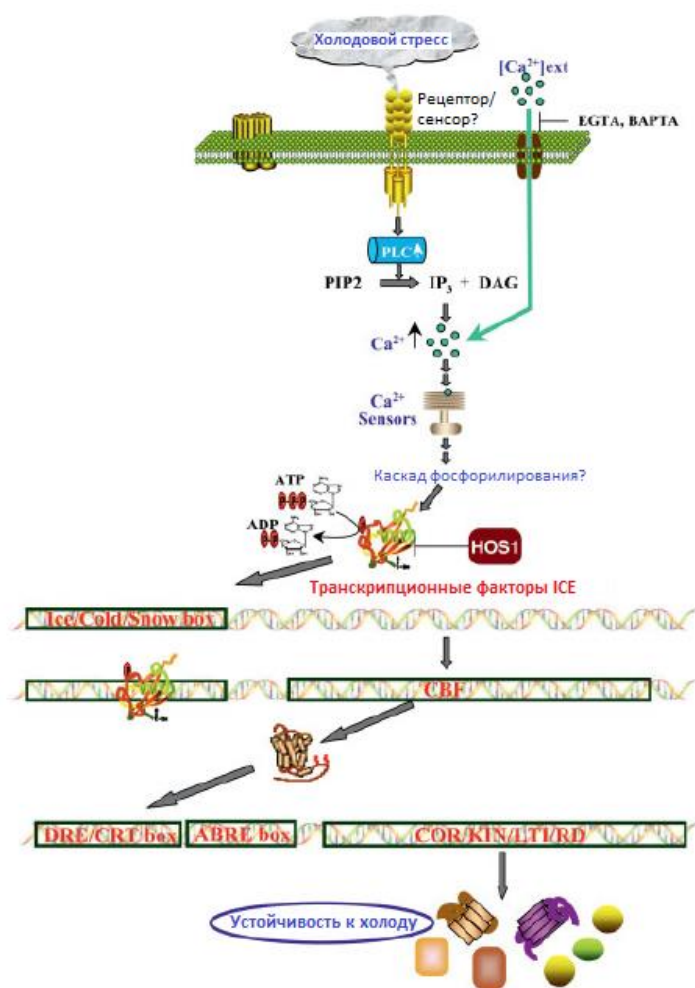


Рис. 1. Общая схема ответа растения на холодовой стресс (на примере регулона CBF/DREB1). Внеклеточный сигнал воспринимается мембранными рецепторами, которые активируют PLC. PLC гидролизует PIP2 до IP3 и DAG. Это приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле, что воспринимается кальциевыми сенсорами и активирует каскад фосфорилирования. Фосфорилирование активирует белки транскрипционных факторов, экспрессирующихся на конститутивном уровне, которые связываются с цис-элементами других ТФ и активируют их. В конечном итоге продукты генов-мишеней приводят к развитию устойчивости (адаптировано из Tuteja, 2009).

1.2.1. Механизмы восприятия и передачи холодowego сигнала

Первичным сенсором низкой температуры считается ПМ, однако изменение конформации и денатурация белков и нуклеиновых кислот (НК), деполимеризация элементов цитоскелета и изменение концентрации метаболитов также участвуют в восприятии сигнала (Chinnusamy et al., 2007). Холод приводит к затверждению липидной части мембран, это вызывает перестройку цитоскелета и индукцию чувствительных к натяжению мембраны Ca^{2+} каналов, что приводит к входу Ca^{2+} из

апопласта в клетку (Thomashow, 1999; Orvar et al., 2000; Los et al., 2013). Изменения в концентрации Ca^{2+} в цитоплазме воспринимаются специфическими сенсорными белками CBL (calcineurin B-like) и CDPK (calcium-dependent protein kinases), активирующими каскады фосфорилирования белков, включающими каскады протеинкиназ CIPK (CBL-interacting protein kinases) и MAPK (mitogen activated protein kinases) (Медведев, 2005; Mahajan and Tuteja, 2005). В передаче сигнала участвуют также другие вторичные мессенджеры: РФК, IP_3 (Mahajan and Tuteja, 2005; Chinnusamy et al., 2007).

1.2.2. Транскрипционные факторы, регулирующие ответ на холод

Транскрипционные факторы играют главную роль в ответе на абиотический стресс (Mahajan and Tuteja, 2005). Транскрипционными факторами называют белки, имеющие в своем составе ДНК-связывающий домен, взаимодействующий с цис-элементами, присутствующими в промоторе целевого гена. Они индуцируют или подавляют экспрессию генов, выступая, соответственно, как активаторы или репрессоры. ТФ делят на группы согласно типу содержащихся в них ДНК-связывающих доменов. Группа генов, контролируемая определенным типом транскрипционных активаторов, называется регулоном. При рассмотрении ответа растений на холодостресс можно выделить 4 основных регулона: CBF/DREB (CRT-binding factor/dehydration response element binder); NAC (NAM, ATAF, CUC)/ZF-HD (zinc-finger homeodomain); AREB/ABF (ABA-responsive element-binding protein/ABA-binding factor); и MYC (myelocytomatosis oncogene)/MYB (myeloblastosis oncogene). Первые два из названных являются независимыми от абсцизовой кислоты (АБК), два других – АБК-зависимыми.

АБК-независимые регулоны

Регулон CBF/DREB

Многочисленные исследования доказали ведущую роль этого регулона в контроле устойчивости к холоду (Chinnusamy et al., 2007; Thomashow, 2010).

В 1994 году был идентифицирован цис-элемент в промоторе генов *COR*, отвечающий за их активацию холодом и обезвоживанием (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994): это последовательность CCGAC, получившая название CRT (C-

repeat). Транскрипционные факторы, способные связываться с CRT, называют CBF (CRT-binding factors) или DREB1 (DRE-binding proteins 1). Белки CBF/DREB1 были выделены при дрожжевом одногибридном скрининге с последовательностью CRT в качестве «наживки» (Stockinger et al., 1997). Это семейство является высококонсервативным в царстве растений и было обнаружено даже в растениях, не способных к акклиматизации, таких, как томат и рис (Thomashow, 1999). Гомологи генов семейства могут применяться для повышения стрессоустойчивости хозяйственно ценных видов растений (Почтовый и др, 2013).

Экспрессия генов *CBF/DREB1* индуцируется через 10-15 минут после начала действия холода, достигает максимума через 2-3 часа и возвращается к базальному уровню через 24 часа (Gilmour et al., 2004). Показано, что регулон CBF включает в себя 109 генов, относящихся к нескольким группам (Fowler, Thomashow, 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005).

1. Белки-криопротекторы

Гены *COR* (cold-regulated), также называемые *KIN* (cold-induced), *RD* (responsive to dehydration), *LTI* (low-temperature-induced) или *ERD* (early, responsive to dehydration) кодируют гидрофильные белки, принадлежащие к семействам дегидринов, или LEA (LATE EMBRYODENESIS ABUNDANT), а также *COR413* (Breton et al., 2003). Эти белки участвуют в стабилизации клеточных мембран, защите других белков от холодовой инактивации *in vitro* и их ренатурации (Thomashow, 1999).

Белки CBF специфически связываются с последовательностью CRT (C-repeat) в промоторе генов *COR* и активируют их экспрессию (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994). Это связывание происходит путем привлечения хроматин-моделирующего комплекса типа Ada/SAGA (Stockinger et al., 2001). Недавно было установлено, что медиаторный комплекс, состоящий из нескольких субъединиц, контролирует экспрессию генов *COR* путем привлечения хроматин-ремоделирующего комплекса и РНК-полимеразы II к проморам генов *COR*. Это необходимо для успешной активации экспрессии с помощью ТФ CBF и развития устойчивости к холоду. Основную роль в этом процессе играют три субъединицы комплекса, кодируемые генами *SFR6/MED16* (*SENSITIVE TO FREEZING6/MEDIATOR16*), *MED2* и *MED14* (Hemsley et al., 2014).

2. Регуляторные белки

Около 10% генов, входящих в регулон CBF, кодируют ТФ (Fowler and Thomashow, 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005). Были выделены и изучены гены ТФ *RAP2.1* (*RELATED TO AP2.1*) и *RAP2.7* и *STZ/ZAT10* (*SALT TOLERANCE ZINC FINGER*), контролирующие субрегулоны регулона CBF (Fowler and Thomashow, 2002). Ген *STZ/ZAT10* кодирует ТФ с «цинковыми пальцами», который репрессирует экспрессию генов, содержащих мотив AGT в промоторе: *RD29A*, *COR15A*, *COR47*, *KIN1* (Saibo et al., 2009). В свою очередь, *STZ/ZAT10* негативно регулируется геном *LOS2* (*LOW EXPRESSION OF OSMOTIC STRESS-RESPONSIVE GENES 2*), кодирующим енолазу (Lee et al., 2002). *CBF1* также участвует в гиббереллин-зависимом ингибировании роста растения под действием холода (Achard et al., 2008).

CBF регулируют также некоторые гены белков-компонентов сигнальных путей, такие как *PLC1* (*PHOSPHOINOSITIDE-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C-1*), *CIPK25* (*CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE25*), *PP2C* (*PROTEIN PHOSPHOTASE2C*). Пять генов кодируют протеазы или ингибиторы протеаз (Fowler and Thomashow, 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005). Предполагается, что индуцируемые холодом протеазы участвуют в деградации денатурированных клеточных белков (Levy et al., 2004).

3. Ферменты биосинтеза гормонов и метаболитов

Гены *CBF* участвуют в биосинтезе раффинозы, контролируя экспрессию гена галактинол синтазы (Fowler and Thomashow, 2002), а также жирных кислот путем регуляции экспрессии гена *ADS2* (*ACYL-LIPID DESATURASE2*), кодирующего D9-ацил-липид-десатуразу (Maruyama et al., 2004). В регулон входят и гены биосинтеза пролина (Fowler and Thomashow, 2002).

Суперэкспрессия генов *CBF/DREB1* в *A.thaliana* приводит к развитию устойчивости трансгенных растений к воздействию солевого стресса, обезвоживания и холода (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2000). При этом одновременно повышается относительное содержание транскриптов генов устойчивости к стрессам и концентрация сахаров в клетке (Gilmour et al., 2004). Повышенная устойчивость к стрессам также связана с повышенной эффективностью фотосинтеза и большей фотосинтетической

ёмкостью (Hsieh et al., 2002). При суперэкспрессии генов *CBF/DREB1* в рисе и томате наблюдались схожие физиологические эффекты (Hsieh et al., 2002; Oh et al., 2005; Ito et al., 2006). Это говорит о том, что механизмы ответа на стресс сходны у одно- и двудольных растений.

Существуют данные о том, что *CBF2/DREB1C* является негативным регулятором генов *CBF1/DREB1B* и *CBF3/DREB1A* (Novillo et al., 2004), однако другие исследования не подтверждают эту теорию (Gilmour et al., 2004). Ген *MYB15* негативно регулирует *CBF* (Saibo et al., 2009). Этот транскрипционный фактор, в свою очередь, негативно регулируется сумоилированной формой белка ICE1 (Saibo et al., 2009). Гены *CAMTA1-3* (*CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR3*) являются позитивными регуляторами экспрессии *CBF1-3* (Kim et al., 2013). В промоторе генов *CBF* обнаружено 7 мотивов длиной 6-9 пар нуклеотидов (пн) (CM1-CM7), участвующих в регуляции этих генов (Doherty et al., 2009). Главная роль в регуляции регулона *CBF/DREB1* принадлежит генам *INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1)* (Chinnusamy et al., 2003) и *ICE2* (Fursova et al., 2009). Структура и функции генов семейства *ICE* рассматриваются в разделе 1.3. Несмотря на то, что данный регулон считается АБК-независимым (Medina et al., 1999), Knight и др. обнаружили, что промоторы генов *CBF1-3* индуцируются экзогенным воздействием АБК (Knight et al. 2004).

Транскрипция генов *CBF1-3* регулируется циркадными ритмами: уровень их транскрипции достигает максимума в течение четырех часов после начала светового дня и минимума через 16 часов. Подобная закономерность наблюдается как в нормальных условиях (Harmer et al., 2000), так и при холодовом воздействии (Fowler et al., 2005). Уровни транскрипции генов-мишеней *CBF* также меняются, но достигают максимума и минимума примерно на 8 часов позже *CBF*, то есть на время, предположительно требующееся для трансляции мРНК *CBF* и передачи сигнала.

Таким образом, холодовой ответ, опосредованный регулоном *CBF/DREB1*, является строго контролируемым механизмом. Такой контроль, возможно, позволяет избегать нежелательного влияния на физиологию растения, таких как карликовость (Gilmour et al., 2004). Регулон *CBF/DREB1* является главным регулоном холодовой устойчивости, в него входят до 84% всех генов,

активируемых холодом, что было показано изучением транскриптома *A.thaliana* на полногеномных микрочипах (Vogel et al., 2005).

Регулон NAC и ZF-HD

Транскрипция гена *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1* (*ERD1*), кодирующего ClpD, регуляторную субъединицу протеазы Clp, повышается в ответе на обезвоживание и солевой стресс. *ERD1* активируется ТФ семейств NAC (NAM, ATAF, CUC) и ZF-HD (zinc-finger homeodomain), объединенными в один регулон (Saibo et al., 2009).

Ген *STRESS-RESPONSIVE NAC1* (*SNAC1*) кодирует ТФ, индуцируемый обезвоживанием и экспрессирующийся в замыкающих клетках устьиц. Суперэкспрессия гена вызывает повышение частоты закрывания устьиц и чувствительности к АБК, что приводит к устойчивости к обезвоживанию. *SNAC1* также индуцирует экспрессию генов, регулирующих осмотическое давление (транспортер сорбитола, экзогликолаза) и стабильность клеточных мембран, что также можно связать с ответом на стресс (Hu et al., 2006).

Регулоны, активируемые АБК

AREB/ABF

Индукцируемое стрессами различной природы повышение концентрации АБК приводит к активации транскрипции генов семейства *AREB* (*ABF*), кодирующих транскрипционные факторы с «лейциновой застёжкой» (Tuteja, 2007). Некоторые из этих транскрипционных факторов, такие как AREB1 и AREB2, для активации требуют посттрансляционных модификаций, включающих АБК-зависимое фосфорилирование серина и треонина в консервативных регионах этих белков (Furihata et al., 2006). Белки AREB активируют экспрессию генов *RAB18*, *RD29B* и *RD29A* (Choi et al. 2000). Эти и другие гены-мишени содержат в промоторе цис-элемент ABRE (ABSCISIC ACID BINDING RESPONSE ELEMENT). Они кодируют гидрофильные глицин-богатые белки, принадлежащие к семейству дегидринов и играющие важную роль в защите растений от холодового стресса, обезвоживания и засоления. Трансгенные растения с повышенной экспрессией генов данного регулона обладают устойчивостью к абиотическим стрессам (Kim et al., 2004).

В передачу АБК-зависимого сигнала также вовлечены Snf1-подобные протеинкиназы. Члены этого семейства белков (SnRK2) активируются обезвоживанием, повышенной соленостью и АБК и участвуют в закрытии устьиц (Mustilli et al., 2002). Белки SnRK2 активируют транскрипционные факторы, индуцирующие экспрессию генов ответа на осмотический стресс (Umezawa et al., 2004). Snf1-подобные протеинкиназы KIN10 и KIN11 из семейства SnRK1 участвуют в ответе на различные стрессовые воздействия, активируя гены, содержащие G-бокс (CACGTG) в своем промоторе, такие как *DARK INDUCED 6 (DIN6)* (Baena-Gonzalez et al., 2007).

Регулон MYC/MYB

Экспрессия гена *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 22 (RD22)* индуцируется в ответ на обезвоживание и АБК (Abe et al., 2003). Проморная область *RD22* содержит сайты связывания транскрипционных факторов MYC и MYB. Эти цис-элементы имеют последовательности CANNTG и C/TAACNA/G, соответственно. Для активации *RD22* требуется совместное действие MYC и MYB. Роль TF семейства MYB в регуляции ответа на холод была доказана для одно- и двудольных растений (Agarwal et al., 2006; Su et al., 2010).

Исследование транскриптома трансгенных растений, суперэкспрессирующих *MYC* и *MYB*, выявило у них изменения экспрессии не только АБК-индуцируемых, но и генов, реагирующих на жасмоновую кислоту. Это говорит о возможных общих путях регуляции ответов на биотические и абиотические стрессовые воздействия (Abe et al., 2003). Ген *NTL6* кодирует мембраносвязанный транскрипционный фактор семейства NAC, который протеолитически активируется под воздействием АБК и индуцирует экспрессию генов *PR (PATHOGENESIS-RELATED)*. Возможно, это является адаптивной стратегией, защищающей растение от атаки гидрофильными патогенами, что часто происходит при холодовом стрессе (Seo, Park, 2010).

Другие транскрипционные факторы

Гены *HIGHER EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 9* и *10 (HOS9* и *HOS10)* позитивно регулируют экспрессию генов холодового ответа,

действуя независимо от CBF/DREB1, а также положительно влияют на экспрессию *NCED*. *HARDY (HRD)* – ген ТФ, принадлежащего к семейству AP2-EREBP, экспрессируется в основном в соцветиях, обеспечивая их защиту от обезвоживания. Ген *ESK1 (ESKIMO1)* кодирует белок, содержащий домен DUF231. Белок ESK1 является негативным регулятором АБК-зависимого пути холодового ответа (Saibo et al., 2009).

ZAT12 кодирует транскрипционный репрессор с «цинковыми пальцами»; белок ZAT12 имеет несколько общих с *CBF2* генов-мишеней и способен оказывать негативное влияние на экспрессию генов регулона CBF/DREB (Vogel et al., 2005). *ZAT12* также регулируется белком SAMTA3 (Doherty et al., 2009). Исследование транскриптома *A.thaliana* под действием холодового стресса с помощью микрочипов показало, что 8% всех генов, активируемых холодом, принадлежат регулону ZAT12 (Vogel et al., 2005), однако они еще мало изучены.

1.2.3. Физиологические перестройки в ходе акклиматизации

Рассмотренные выше генетические механизмы в конечном итоге способствуют выработке белков, выполняющих функции осмопротекции (ферменты биосинтеза пролина, глицин-бетаина и сахаров), восстановления структуры и функций белков (молекулярные шапероны, белки теплового шока), поддержания водно-ионного баланса (аквапорины и ионные транспортеры) (Tuteja, 2009; Войников, 2013). В нейтрализации РФК принимают участие ферменты-антиоксиданты (каталаза, аскорбатпероксидаза, супероксиддисмутаза, альтернативная оксидаза), липидорастворимые антиоксиданты (α -токоферол и каротеноиды), органические ионы (глутатион, аскорбат) (Tuteja, 2009; Saibo et al., 2009; Креславский и др., 2012). В ходе акклиматизации происходят изменения в липидном метаболизме, синтез ацильных липидов (Войников, 2013; Kawamura and Uemura, 2014). Экспрессия гена галактолипидгалактозилтрансферазы *SFR2* индуцируется холодом; этот фермент участвует в синтезе олигогалактозилдиацилглицеридов, повышающих выживаемость при стрессе (Takami et al., 2010).

Однако главной целью акклиматизации является стабилизация мембран (Thomashow, 1999). В стабилизацию вовлечены различные механизмы, такие как

изменение липидного состава мембран (Steponkus, 1984), накопление осмопротекторов (Tuteja, 2009). Они способствуют защите от холодовых повреждений клеток у многих организмов, от бактерий до растений и животных. Осмопротекторы повышают осмотический потенциал, стабилизируют макромолекулярные структуры и мембраны, способствуют работе белков-шаперонов. Существует корреляция между содержанием этих веществ в растении и его холодовой устойчивостью (Tuteja, 2009).

Белки COR играют главную роль в физиологических перестройках, приводящих к повышению холодоустойчивости клеток. На основании гомологии и общих функций белки COR объединяют в несколько групп, среди которых важное место занимают семейства дегидринов и АБК-зависимые белки RAB (RESPONSIVE TO ABSCISIC ACID) (Войников, 2013). Гидрофильные белки дегидрины, объединенные в группу II (или семейство D11) белков LEA, участвуют в повышении холодоустойчивости мембранных структур клетки (Close, 1997). В этих белках повышено содержание глицина. Среди белков COR COR47, ERD10, и ERD14 характеризуются невысоким содержанием глицина, однако это компенсируется их повышенной гидрофильностью (Thomashow, 2010).

Ген *COR15a* кодирует полипептид массой 15 кДа, который процессируется в хлоропластах с образованием зрелого полипептида COR15am массой 9,4 кДа (Lin and Thomashow, 1992). Конститутивная экспрессия *COR15a* в трансгенном *A.thaliana* повышает устойчивость к холоду (Artus et al., 1996). Анализ *in vivo* и *in vitro* показал, что COR15am стабилизирует мембраны хлоропластов, снижая склонность мембран к переходу в фазу H_{II}. За счет амфипатических α -спиралей COR15am изменяет кривизну внутренней мембраны хлоропластов, снижая вероятность формирования гексагональных структур (Steponkus, 1984; Steponkus et al., 1998). Предполагается, что другие белки COR действуют схожим образом (Thomashow, 1999). Помимо стабилизации мембран, некоторые белки COR участвуют в защите других белков от низкотемпературной инактивации *in vitro*, связывании ионов и ренатурации белков (Tuteja, 2009).

Большую текучесть при низких температурах мембранным липидам обеспечивает образование двойных связей между углеродными атомами в цепях жирных кислот при помощи десатураз (Лось, 2014). Показано, что экспрессия

генов десатураз в растениях приводит к повышению устойчивости к холоду (Demin et al., 2011). В устранении разрывов клеточных мембран вследствие давления кристаллов льда участвует Ca^{2+} -зависимый механизм «скрепления» мембран, опосредованный белком SYT1 (Yamazaki et al., 2008).

Таким образом, на сегодняшний день общую схему генетического контроля ответа растений на холодовой стресс можно представить в виде сети ТФ и генов, непосредственно отвечающих за морфофизиологические изменения, приводящие к холодной устойчивости (рис. 2)

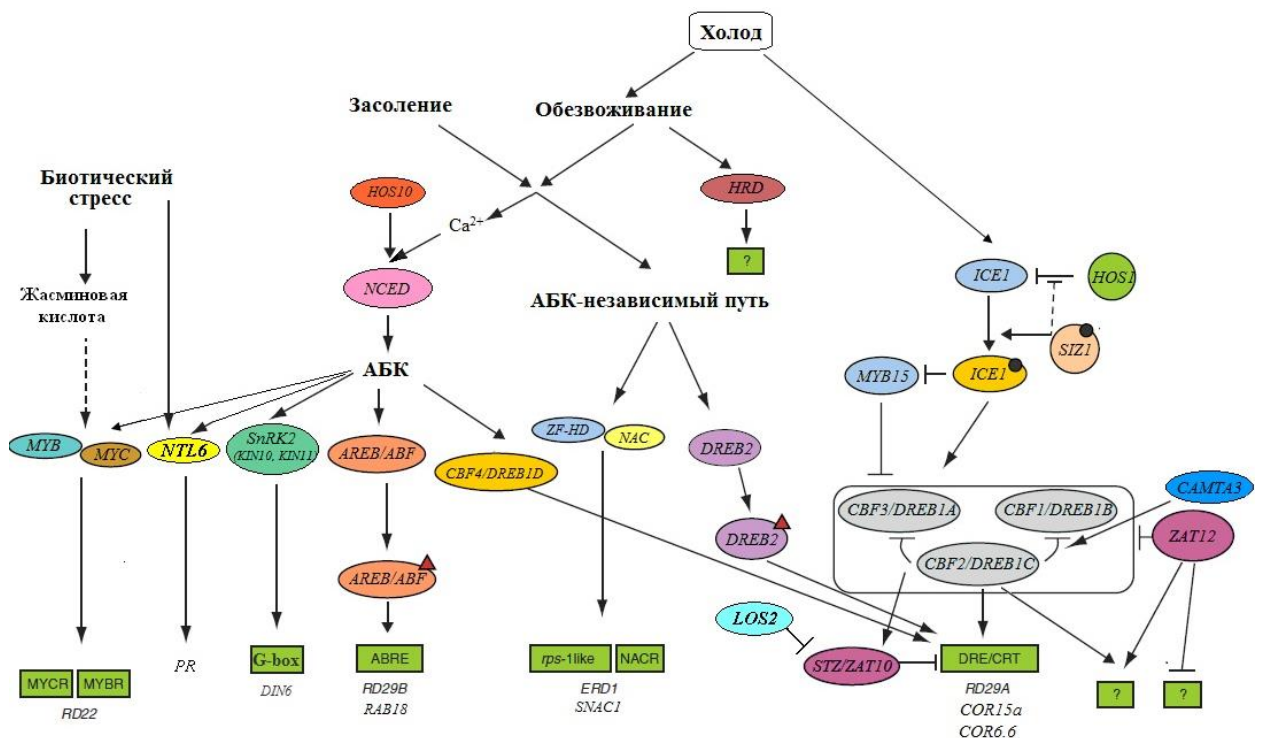


Рис. 2. Схема генетического контроля ответа на абиотические стрессовые факторы и его взаимодействие с ответом на биотические факторы. В овалах представлены гены, кодирующие транскрипционные факторы. В прямоугольниках выделены цис-элементы в промоторах генов-мишеней, с которыми взаимодействуют соответствующие транскрипционные факторы. Гены-мишени представлены под цис-элементами. Черные точки обозначают сумоилированную форму транскрипционных факторов. Треугольники обозначают иные модификации (адаптировано из Saibo et al, 2009, с дополнениями).

1.2.4. Роль растительных гормонов и метаболитов в ответе на холод

Роль абсцизовой кислоты

Известно, что содержание АБК увеличивается в клетке под действием стресса (Шакирова, 2001). Этот гормон играет большую роль как в развитии немедленного

стрессового ответа, так и при акклиматизации. В нормальных условиях АБК синтезируется в растениях из каротеноидных предшественников на базальном уровне, необходимом для роста и развития (Tuteja, 2007). Последовательные этапы биосинтеза АБК представлены на рис. 3.

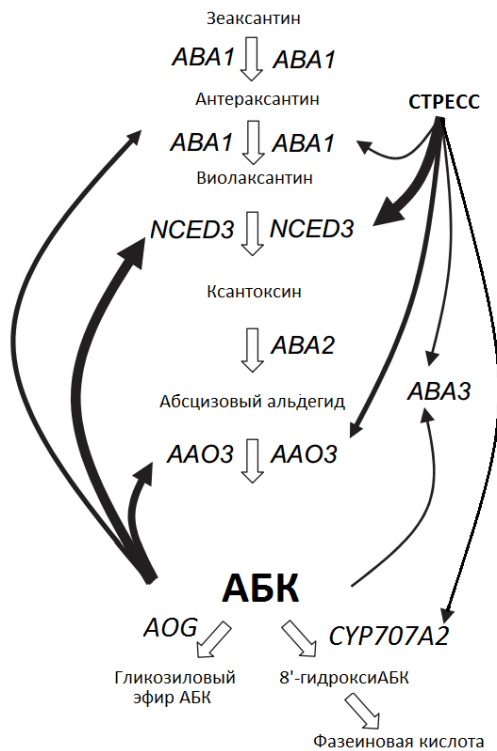


Рис. 3. Регуляция метаболизма АБК. Белые стрелки обозначают последовательные этапы биосинтеза и катаболизма. Позитивные регуляторные сигналы обозначены черными стрелками; толстые стрелки означают наиболее значимую регуляцию (адаптировано из Barrero et al., 2006, с дополнениями).

При осмотическом стрессе Ca^{2+} -зависимый каскад фосфорилирования белков вызывает индукцию экспрессии генов *NCED* (9-цис-эпоксикаротеноид диоксигеназы) (Tuteja, 2007). Последующее накопление АБК индуцирует экспрессию других генов биосинтеза АБК: *AAO3* (альдегид оксидаза), *MCSU/LOS5/ABA3* (сульфураза молибденового кофактора) и *ZEP/LOS6/ABA1* (зеаксантин эпоксидаза) (Tuteja, 2007). Ген оксидогеназы/редуктазы *ABA2* не индуцируется стрессом и АБК (Barrero et al., 2006). Согласно недавно полученным данным, низкотемпературный стресс приводит к повышению экспрессии гена *NCED3* во флоральных меристемах, а в листьях розетки, наоборот, ингибирует (Baron et al., 2012). Экспрессия гена *ABA1* активируется осмотическим и низкотемпературным стрессами по всех тканях (Tuteja, 2007; Baron et al., 2012), АБК катаболизируется путём гидроксилирования или конъюгации (рис. 3) (Tuteja, 2007). Конъюгация происходит в основном с образованием гликозилового эфира АБК под контролем гликозилтрансферазы (AOG). Известны три пути гидроксилирования АБК, однако основным считают образование 8'-

гидроксиабсцизовой кислоты с последующей изомеризацией в фазеиновую кислоту, которое осуществляется 8'-гидроксилазами, кодируемыми генами семейства *CYP707A* (*CYROCHROME P450 707A*), *CYP707A1–CYP707A4* (Kushiro et al., 2004). Показано, что экспрессия гена *CYP707A2* повышается во всех органах в ответ на низкие температуры (Baron et al., 2012).

Роль других растительных гормонов и метаболитов

В той или иной степени все гормоны растений участвуют в развитии ответа на стресс. Одной из функций двухкомпонентной системы сигналинга цитокинина TCS (two-component signaling system) является негативная регуляция ответа на холодовой стресс путем снижения чувствительности к АБК (Urao et al., 1999). Показано участие брассиностероидов в повышении устойчивости растений к фотоокислительному и холодовому стрессам, а также к заражению вирусами. Эти гормоны отвечают за накопление РФК, которые отвечают за регуляцию генов (Xia et al., 2010). Известно и о роли этилена в ответе на стресс (Wang et al., 2007).

Под действием низкой температуры растения накапливают органические осмолиты, или осмопротекторы (Kamata and Uemura, 2004). Эти вещества имеют низкую молекулярную массу и высокую растворимость в воде, при этом они не токсичны для растения даже в высокой концентрации. К ним относятся амины (глицилбетаин, полиамины), сахара (глюкоза, трегалоза, фруктоза, сахароза, раффиноза), соли органических кислот (оксалат, малат), альдиты (маннитол, миоинозитол, сорбитол), аминокислоты (пролин). Трансгенные растения, суперэкспрессирующие гены биосинтеза осмопротекторов, обладают повышенной устойчивостью к стрессам (Kishor et al., 1995; Sakamoto et al., 2000). Некоторые осмопротекторы и осмолиты также изменяют экспрессию генов холодового ответа. К примеру, известно, что пролин индуцирует экспрессию многих генов, содержащих последовательность PRE (proline-responsive element), АСТСАТ, в промоторе (Sato et al., 2002). Низкомолекулярные органические катионы-полиамины (путресцин, спермин, кадаверин, спермидин) также участвуют в защите растений от РФК. Они способствуют обезвреживанию кислородных радикалов, активации экспрессии генов ферментов синтеза антиоксидантов и генерации пероксида водорода, служащего сигнальной молекулой (Кузнецов и др., 2006).

1.2.5. Взаимосвязь между регуляцией ответа на холод и времени зацветания

Центральная роль в системе контроля цветения принадлежит генам *FRI* (*FRIGIDA*), *FLC* и *SOC1*. *FRI* кодирует белок, который в составе модифицирующего хроматин белкового комплекса поддерживает высокую экспрессию гена *FLC* и предотвращает раннее цветение *A. thaliana* без яровизации (Choi et al., 2011). Ген *FLC* кодирует белок с MADS доменом, репрессирующий цветение путем подавления экспрессии генов *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) и *SOC1* (Helliwell et al., 2006). Яровизация приводит к снижению экспрессии *FLC* (Heo and Sung, 2011). Недавно было показано, что ген *SOC1* находится в центре сетей регуляции зацветания, объединяя различные цепи регуляции (Immink et al., 2012). Существует перекрестной связи между ответом на холод и регуляцией цветения (Seo et al., 2009). Ключевыми компонентами взаимной регуляции цветения и ответа на гипотермию являются гены *SOC1*, *CBF1-3* и *FLC*. Гены *CBF* активируются холодом и активируют экспрессию *FLC*, который негативно регулирует гены цветения, что приводит к его задержке. Гены-активаторы цветения *FPA*, *FVE*, *GI* и *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*) негативно регулируют экспрессию *CBF* (Kim et al., 2004; Seo et al., 2009). *SOC1* действует как репрессор транскрипции генов *CBF* путем связывания с цис-элементами CArG в их промоторе (Seo et al., 2009), а также репрессирует ряд других ТФ холодового ответа, в частности *GNC* и *GNL* (Richter et al., 2013). Эта схема действует при кратковременном воздействии пониженной температуры. Возможно, существуют и другие механизмы, осуществляющие связь регулирующие ответ на холод и цветение: ТФ семейства NAC LOV1 (*LONG VEGETATIVE PHASE 1*) контролирует гены ответа на холод по *CBF*-независимому пути и действует как флоральный репрессор (Yoo et al., 2007).

1.3. Семейство ICE: структурные особенности и функции

1.3.1. Структурные особенности

Как все члены семейства bHLH, белки ICE имеют область кислотных аминокислот в N-концевом участке и ДНК-связывающий и/или димеризационный домен bHLH в C-конце (Purugganan and Wessler, 1994). Область умеренной гомологии ICE1 и ICE2 в N-конце белка содержит консервативный мотив KRAAM,

ответчающий за роль ICE1 и ICE2 в дифференцировке устьиц (Kanaoka et al., 2008). Фосфорилирование/дефосфорилирование остатка серина в серин-богатой области регулирует активности белков ICE (Chinnusamy et al., 2003). С-концевые области ICE высоко гомологичны и содержат сайт сумоилирования (Miura et al., 2007).

ДНК-связывающий домен bHLH

Белки семейства bHLH содержат консервативный домен типа основная спираль-петля-спираль (basic Helix-Loop-Helix), который связывается с доменом MYC, присутствующим в промоторе их генов-мишеней. bHLH состоит из 60 аминокислотных остатков и имеет два функционально различных мотива (Anthony-Cahill et al., 1992). Основной мотив локализован в N-терминальном регионе домена. Он состоит из 15 консервативных аминокислот и обуславливает специфичность ДНК-белковых взаимодействий. Три аминокислотных остатка в N-конце домена (Asp, Glu, Arg) являются ключевыми для связывания с ДНК (Grandori et al., 2000). Мотив HLH локализован в С-конце. Он богат гидрофобными остатками, формирующими две амфипатические α -спирали, соединенные петлей переменной длины. Этот мотив отвечает за димеризацию факторов и/или их взаимодействие с ДНК. Некоторые белки bHLH формируют только гомодимеры, а другие формируют гетеродимеры с одним или несколькими родственными белками семейства (Ellenberger et al., 1994).

Аминокислотные последовательности домена bHLH идентичны у ICE1 и ICE2 (Fursova et al., 2009). ICE1 специфично связывается с регуляторными элементами MYC-типа, присутствующими в промоторе гена *CBF3* (Chinnusamy et al., 2003). Zarka et al. идентифицировали короткие последовательности в промоторе гена *CBF2*, ICEr1 и ICEr2 (inducer of CBF expression region 1 и 2), необходимые для активации (Zarka et al., 2003). Однако Benedict и др. обнаружили, что цис-элементы ICEr3 и ICEr4 являются более вероятными кандидатами на роль главных элементов ранней активации *CBF* холодом (Benedict et al., 2006).

Димеризационный домен типа «лейциновая застежка»

Многим MYC-факторам необходимы дополнительные ТФ для активации транскрипции генов-мишеней. Они формируют димерные комплексы с помощью

доменов bHLH или «лейциновых застежек». Домен bZIP может выступать в роли димеризационного в белках ICE (Murre et al., 1989; Vaxevanis and Vinson, 1993). ICE1 и ICE2 образуют гетеродимеры с регуляторами образования устьиц, но не связываются друг с другом (Kanaoka et al., 2008). Есть данные о взаимодействии ICE1 с MYB15, негативным регулятором экспрессии генов *CBF* (Agarwal et al., 2006).

1.3.2. Функции

Роль в ответе на холод

Белок ICE1 присутствует в клетке и при нормальных температурах, однако для активации его работы требуется индуцируемое холодом пост-трансляционное фосфорилирование (Saibo et al., 2009). Кроме того, белок ICE1 негативно регулируется белком HIGHER EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1). HOS1 является лигазой типа RING E3, приводящей к убиквитинированию и последующей деградации ICE1 (Dong et al., 2006). В нормальных условиях HOS1 локализован в цитоплазме, но при пониженной температуре он транслоцируется в ядро, где и взаимодействует с ICE1. Показано, что убиквитинирование ICE1 может быть заблокировано путем сумоилирования, т.е. навешивания белка SUMO (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER), опосредованного белком SIZ1, лигазой типа SUMO E3 (Miura et al., 2007). Деградация ICE1 необходима для аттенюации холодового сигнала, что обеспечивает временную экспрессию холод-индуцируемых генов.

Активированный белок ICE1 индуцирует транскрипцию *CBF3*, что было доказано с использованием мутантов по гену и трансгенных линий, суперэкспрессирующих *ICE1* (Chinnusamy et al., 2003). Кроме того, по данным анализа транскриптома на микрочипах, *ICE1* в той или иной степени участвует в регуляции экспрессии 38% генов, участвующих в передаче холодового сигнала, а также ряда TF семейств AP2, bZIP и WRKY (Lee et al., 2005). Есть данные об участии *ICE1* в активации экспрессии *ZAT12* и *NAC072* (Benedict et al., 2006).

Роль *ICE2* в холодовом ответе меньше изучена. Трансгенные растения *A.thaliana*, суперэкспрессирующие *ICE2*, обладали повышенной устойчивостью к холоду после акклиматизации, а их семена содержали повышенное число липидов

(Fursova et al., 2009). Также было показано, что экспрессия *CBF1* повышается у трансгенных растений под действием холода, следовательно, *ICE2* является позитивным регулятором регулона CBF/DREB1 (Fursova et al., 2009).

Генетический контроль развития устьиц

Канаока с коллегами показали, что *ICE1* (*SCREAM* (*SCRM*)) и *ICE2* (*SCRM2*) участвуют в развитии устьиц (Канаока et al., 2008). Доминантная мутация *SCRM* вызывает конститутивную дифференцию устьиц в эпидермисе. Рecessивные мутанты по генам *SCRM* и *SCRM2* фенотипически схожи с мутантами *fama*, *mut*, и *spch*. Гены *SPCH* (*SPEECHLESS*), *MUTE* и *FAMA*. регулируют образование устьиц в результате серии стереотипических делений (рис. 4). Протодермальные клетки, называемые материнскими меристемоидными (MMC – meristemoid mother cells), асимметрично делятся, образуя небольшие треугольные клетки. Эти клетки, меристемоиды, обладают временными свойствами стволовых клеток и проходят несколько раундов асимметричных делений, таким образом увеличивая число клеток окружения (stomatal lineage ground cells - SLGCs). Затем меристемоиды дифференцируются в круглые материнские замыкающие клетки (guard mother cells - GMC), образующие пару замыкающих клеток в результате симметричного деления и последующего неравномерного растяжения (Bergmann et al., 2007). Развитие MMC в меристемоиды контролируется геном *SPCH*, меристемоидов в GMC - *MUTE*, GMC в замыкающие клетки – *FAMA*.

SCRM и *SCRM2* формируют гетеродимеры с белками *SPCH*, *MUTE* и *FAMA*, обеспечивая специфичность активации генов, необходимых на каждой стадии развития устьиц. Регуляция этими транскрипционными факторами одновременно холодового ответа и дифференцировки устьиц может быть отражением стратегии растений объединить внешние сигналы и программы развития, наиболее точно подстраиваясь таким образом к условиям окружающей среды.

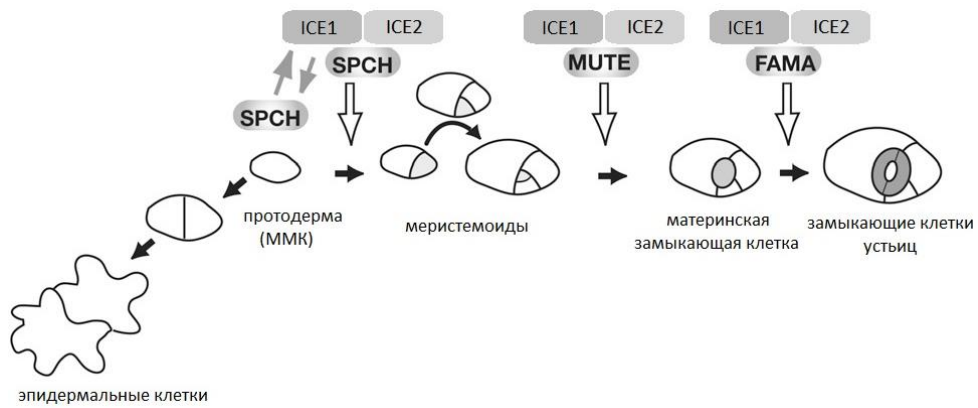


Рис. 4. Схема генетического контроля развития устьиц (адаптировано из Канаока et al, 2008, с дополнениями).

1.4. Внутривидовая изменчивость по устойчивости к холоду и ее генетические основы

1.4.1. Необходимость изучения природного разнообразия растений

В процессе эволюции растительные популяции выработали специфические механизмы адаптации к различным условиям. Адаптация может обеспечивать выживаемость в условиях конкретного местообитания, устойчивость к абиотическому и биотическому стрессу, а также успех в конкуренции с другими видами и популяциями. Особый раздел эволюционной биологии занимается изучением локально адаптированных генотипов (или экотипов) (Clausen et al., 1941). Однако генетические механизмы, лежащие в основе адаптаций к различным условиям, до конца не изучены. Исследования природного разнообразия *A.thaliana* позволяют идентифицировать гены, контролирующие экологически значимые сложные признаки, а также дают понимание процессов эволюции генома, географической структуры популяций и механизмов отбора, формирующих разнообразие по сложным признакам между природными популяциями (Fournier-Level et al., 2011; Hancock et al., 2011; Agren and Schemske, 2012; Weinig et al, 2014). Слияние молекулярной биологии с экологией позволяет исследователям решать фундаментальные вопросы эволюции и экологии. Молекулярно-генетический анализ помогает установить молекулярные механизмы, обуславливающие те или иные фенотипические варианты, в то время как экологический анализ показывает, насколько данный фенотипический вариант адаптирован к определенным условиям среды. Адаптивные способности растений интересуют широкий круг ученых, от

экологов и молекулярных генетиков, изучающих фундаментальные проблемы развития адаптаций, до селекционеров, находящихся в поиске природных популяций, обеспечивающие материал для дальнейшей селекции. В свою очередь, изучение генетического разнообразия является альтернативным методом определения функций кандидатных генов в определенных процессах (Mitchell-Olds and Schmitt, 2006). Анализ природных ресурсов *A.thaliana* дополняет использование лабораторных мутантов в целях анализа наследования количественных признаков и функциональной характеристики генов.

Региональные различия в климате – мощный инструмент действия отбора, приводящий к дифференциации популяций и локальным адаптациям (Clausen et al., 1941), а температура и количество осадков считаются наиболее важными факторами, определяющими микроэволюцию *A. thaliana* (Hoffmann, 2005). Все возрастающий интерес к исследованию природного разнообразия *A.thaliana* обусловлен доступностью природных популяций (рас) и геномных баз данных, что открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения региональных адаптаций к климату. Эти данные делают возможными сравнения между генетическими и климатическими расстояниями между популяциями, позволяют оценивать эволюционный потенциал и, таким образом, предсказывать возможные изменения в ареалах распространения видов и популяций в условиях меняющегося климата (Weinig et al., 2014). Помимо изучения ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphism, SNP) с климатом, интерес представляет также изучение связи экспрессии генов с географическим распределением популяций, что позволяет обнаруживать влияние климата на экспрессию генов, играющих роль в приспособленности (Richards et al., 2012).

Исследование связей SNP-климат ведется также и на других видах растений. В комбинации с поиском и изучением ортологов идентифицированных кандидатных генов в геноме *A.thaliana*, такой подход позволяет определить механизмы адаптации к климату также и для немодельных организмов (Weinig et al., 2014).

1.4.2. Генетические ресурсы *A. thaliana*

Еще 10 лет назад большинство из известных на тот момент нескольких сотен рас *A.thaliana* происходило из Западной Европы. Однако к настоящему времени

описано уже более 7000 генотипически различных рас всего мира (Weigel, 2012) (рис. 5). Эти расы *A.thaliana* доступны исследователям через международные банки семян (ABRC, NASC). Число доступных рас постоянно растет. На важность изучения природного разнообразия *A.thaliana* обратил внимание Maarten Koornneef и его ученики. С середины 1990-х ими был выпущен ряд статей, указывающих на значимость изучения внутривидового полиморфизма для развития различных областей биологии *A.thaliana* и открывших дорогу для множества других исследователей, заинтересовавшихся этой проблемой (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000; Koornneef et al., 2004).

Различное давление отбора в разных частях ареала обусловлено различиями в климатических условиях. Это приводит к возникновению локальных адаптаций, следовательно, можно ожидать связь между фенотипом расы и климатом в зоне ее происхождения, обусловленную генетически. Масштабы природного разнообразия *A.thaliana* по экологически значимым признакам достаточно широки (Weigel, 2012). Существование значительного внутривидового полиморфизма описано для любого фенотипического признака *A.thaliana* (Koornneef et al., 2004), а также проявляется на уровне генетических механизмов, таких как метилирование цитозина (Riddle and Richards, 2002), и на уровне содержания метаболитов (Keurentjes et al., 2006).

Генетические различия между расами положительно коррелируют с географическим расстоянием между ними (Nordborg et al., 2005; Schmid et al., 2006). Это говорит о происходившей длительной географической изоляции и ограниченном потоке генов. Данные о происхождении европейских рас указывают на то, что большая часть ареала была заселена из нескольких ледниковых рефугиумов с одновременным смешением на границах зон заселения. Однако вмешательство человека привело к некоторой гомогенизации между популяциями, особенно в сельскохозяйственных регионах Европы, и интродукции популяций в Северную Америку и Японию (Jorgensen and Mauricio, 2006; Schmid et al., 2006). В настоящее время наибольшее внутривидовое разнообразие *A.thaliana* зафиксировано в западной части ареала вида, на Иберийском полуострове, а также в Северной Африке, наименьший полиморфизм обнаружен в Центральной Азии. Это соответствует представлениям о том, что западные популяции *A.thaliana*

имеют более древнее происхождение, и распространение *A.thaliana* шло с запада на восток (Nordborg et al., 2005; Weigel, 2012). В то же время, существует альтернативная теория распространения *A.thaliana*, с востока на запад, вместе с распространением земледелия (François et al., 2008). Существует также высотный клин по внутривидовому разнообразию: с высотой обитания уменьшается общий полиморфизм между популяциями (Weigel, 2012).

Природные варианты *A.thaliana* ранее обозначались как «экотипы». Этот термин предполагает не просто отличия на генетическом уровне, но и существование группы популяций в уникальной экологической нише и наличие адаптаций, возникших под влиянием климата в различных частях ареала (Turesson, 1922a). В настоящее время в зарубежной литературе наиболее предпочтительным считается использование нейтрального термина «образец» («accession»), указывающего только на то, что данная группа популяций была отобрана для коллекции и получила уникальный идентификатор и не подразумевающий обязательного наличия локальных адаптаций у линий, однако не исключающий их наличия (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000).

Знание о происхождении и фенотипических эффектах нуклеотидного полиморфизма является ключевым для понимания того, как виды приспособляются к окружающей среде. Однако изучение генетического разнообразия *A.thaliana* имеет также и другое потенциальное значение: идентификация генов, не представленных в лабораторных расах (Weigel, 2012). Достаточно большая доля референсного генома расы Columbia (Col-0) отсутствует в некоторых других расах *A.thaliana* (Weigel, 2012). Следовательно, вполне возможно, что и в геноме расы Col-0 отсутствуют некоторые гены, следовательно, важно тщательно исследовать геномы различных рас для обнаружения новых генов. С появлением новых технологий секвенирования эта цель становится вполне достижимой по разумной цене. В 2007 году был анонсирован проект 1001 Геном *A.thaliana* (Weigel and Mott, 2009). Целью проекта стало определение пангенома *A.thaliana*. Задачей первого этапа является сбор образцов (рас) *A.thaliana* по всему ареалу обитания вида для анализа разнообразия на глобальном, региональном и местном уровнях. На втором этапе осуществляется секвенирование методами нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) и сборка геномов.

Богатое природное разнообразие *A.thaliana* дополняется аннотированным геномом, что делает возможным генотипирование с высокой точностью, а также коллекциями нокаут-мутантов, предоставляющих мощный инструмент для подтверждения предполагаемых функций генов, лежащих в основе природного разнообразия.

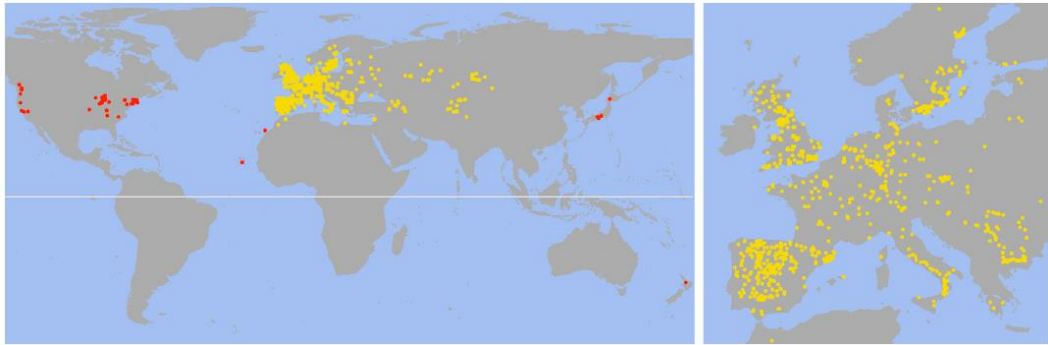


Рис. 5. Географическое распределение более 7000 дикорастущих рас *A.thaliana*. Желтым отмечены аборигенные расы, красным – вероятные интродуценты. Заселена ли территория Китая до побережья Тихого океана аборигенными расами, не ясно. Кроме того, есть данные о наличии рас *A.thaliana* также и в Южной Корее и нескольких странах Африки (не показано) (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000) (Из Weigel, 2012).

1.4.3. Методы изучения адаптаций к климату

Для идентификации генов (и аллелей генов) и установления механизмов, лежащих в основе адаптаций и эволюционных событий, в ходе которых они появились, используют три основные группы методов (рис. 6). Молекулярно-генетические исследования необходимы для идентификации генов, контролирующих различные признаки. Экологические исследования демонстрируют, как организм взаимодействует с особями своего вида, другими видами и окружающей средой. Эволюционная геномика изучает механизмы влияния среды на структуру популяций путем анализа их генетической структуры (Trontin et al., 2011).

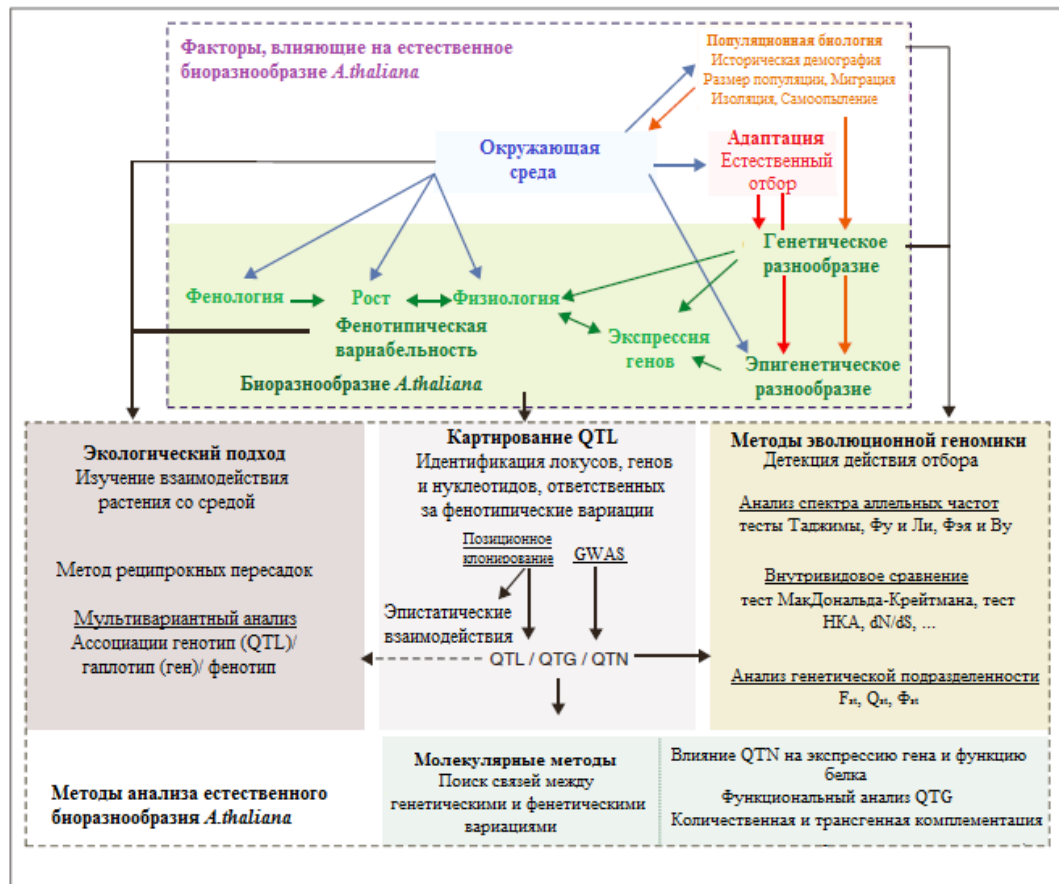


Рис. 6. Схема различных подходов по изучению факторов, влияющих на природное разнообразие *A. thaliana*. В верхней части схемы представлена взаимосвязь между различными факторами, влияющими на природное разнообразие, в нижней описаны стратегии и средства для изучения этого разнообразия (QTL = locus количественного признака; LD = неравновесие по сцеплению; QTG = ген количественного признака; QTN = нуклеотид(ы) количественного признака) (адаптировано из Trontin et al., 2011).

Экологический подход

Метод реципрокных пересадок позволяет продемонстрировать, насколько тот или иной генотип (экотип) является приспособленным к своей климатической нише (Mitchell-Olds and Schmitt, 2006). Эксперименты по пересадке (Transplant experiment), также известные как «common garden experiment» - это эксперимент, при котором один организм перемещается из родных условий окружающей среды в другую среду. Реципрокная пересадка подразумевает перекрестное интродуцирование организмов разных популяций в новые условия.

Такие эксперименты позволяют понять, существует ли генетический компонент, обуславливающий различия между популяциями. Этот подход, считающийся «золотым стандартом» в экологии (Turesson, 19226), крайне редко

был использован в работе с *A.thaliana*. В последнее время успехи молекулярной биологии несколько отодвинули на второй план такие эксперименты, так как с помощью молекулярно-генетических методов изучать генетическое разнообразие стало возможным напрямую. Однако только комбинация полевых исследований, оценки климатических характеристик и молекулярно-генетических методов могут дать наиболее полное представление о генетическом контроле адаптации к различным условиям. К счастью, в последнее время наблюдается возврат к использованию этого метода. Результаты многолетних экспериментов по выращиванию рас в непривычных для них условиях говорят о том, что существует значительная дифференциация по уровню адаптации рас *A.thaliana* (Agren and Schemske, 2012).

Fournier-Level и др. и Hancock и др. (Fournier-Level *et al.* 2011; Hancock *et al.* 2011) провели исследования по реципрокной пересадке нескольких сотен рас *A.thaliana* внутри европейского ареала вида с оценкой таких характеристик приспособленности, как выживаемость и плодовитость. Затем была протестирована ассоциация выживаемости с 213 SNP. Такая комбинация полевых и лабораторных исследований позволила выявить, что SNP связаны с локальной адаптацией, и идентифицировать потенциальных кандидатов на роль генов, определяющих эту адаптацию. Таким образом, было показано, что связь SNP с климатическими условиями является результатом действия естественного отбора.

Картирование локусов, генов и нуклеотидов количественных признаков (QTL/QTG/QTN mapping)

QTL (локус количественного признака) - это район локализации гена/генов, которые влияют на признак. Основная идея картирования QTL была разработана более 30 лет назад (Thoday, 1961). QTL идентифицируются статистическими процедурами. Метод включает поиск ассоциаций между сегрегирующими молекулярными маркерами и изучаемым признаком в экспериментальной популяции для определения сцепления между маркерами и QTL. Для идентификации участков генома, контролируемых сложные для анализа количественные признаки (QTL) анализируют сегрегирующие популяции. В качестве сегрегирующей популяции могут выступать поколения F2, генерации

возвратных скрещиваний (BC), наборы рекомбинантных имбредных линий (RIL), полученные от скрещивания двух или более родительских рас, двойные гаплоидные линии (DHL) (Kover et al., 2009). Классический метод предполагает использование только двух родительских популяций для картирования, однако возможно также использование нескольких родительских линий (Symonds et al., 2005). Несмотря на долгую историю метода и развитие новых подходов анализа генома, метод картирования QTL остается актуальным и по сей день (Shimizu, 2002).

QTL-картирование применяется для изучения генетического контроля различных признаков, таких как время зацветания, строение цветоноса, размер семян, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам (Koornneef et al., 2004). Внедрение современных технологий, например использование геномных микрочипов многократно увеличивает мощность и точность метода картирования локусов количественных признаков (Wolyn et al., 2004).

Новый подход к идентификации QTL предполагает использование данных о неравновесном сцеплении генов (англ. linkage disequilibrium (LD)). Этот метод предполагает установление связи между определенной комбинацией нуклеотидных полиморфизмов (аллелей) разных локусов и фенотипом с использованием статистического подхода (Atwell et al., 2010). Неслучайное распределение частот аллелей разных локусов может быть обусловлено не только тесным генетическим сцеплением генов, но и наличием адаптивного преимущества конкретной комбинации аллелей, частота которой соответственно возрастает в сравнении с частотой, ожидаемой при случайном распределении. Этот метод получил название «Полногеномный поиск ассоциаций» (англ. GWAS - Genome-wide association study) (Weigel, 2012).

Следующим шагом после картирования QTL является тонкое картирование генов (QTG) или нуклеотидов (QTN), находящихся в этих локусах. Подтверждение роли кандидатных генов/нуклеотидов достигается трансгенной комплементацией, при этом кандидатные аллели вводятся в геном различных линий; либо с помощью индуцированного мутагенеза по сайтам предполагаемых QTN (Trontin et al., 2011).

Детекция действия отбора на ген методами популяционной и эволюционной генетики

Методы популяционной и эволюционной генетики помогают определить, какие эволюционные силы (отбор, дрейф генов, популяционная структура) влияли на возникновение и эволюцию адаптивных локусов. Центральное предположение эволюционной геномики состоит в том, что отбор действует на отдельные гены, в то время как популяционные процессы (изменение размеров популяции, миграция) являются случайными силами, действующими на все гены генома. Прогресс в развитии теоретических и статистических методов, а также доступность данных по полиморфизму геномов позволяют исследователям отличать действие отбора от популяционных процессов и, таким образом, идентифицировать гены, лежащие в основе адаптивных вариаций (Luikart et al., 2003).

Отбор изменяет уровень разнообразия на внутри- и межвидовом уровне. Об адаптивной значимости тех или иных аллелей генов можно судить с помощью анализа нуклеотидного полиморфизма популяций (Wright and Gaut, 2005). Популяционная генетика может предсказывать паттерны нуклеотидного полиморфизма на основе стандартной нейтральной модели для идеальных (равновесных) популяций. Затем наблюдаемый полиморфизм сравнивается с ожидаемым с помощью тестов статистических гипотез. В табл. 1 представлено, как разные виды отбора влияют на разнообразие.

Таблица 1. Влияние отбора на внутри- и межвидовое разнообразие (адоптировано из Nielsen, 2005).

Фактор эволюции	Внутривидовое разнообразие	Межвидовое разнообразие	Отношение межвидового разнообразия к внутривидовому	Спектр аллельных частот
Негативный отбор	Снижено	Снижено	Снижено, если отбор не слишком сильный	Повышена доля низкочастотного полиморфизма
Позитивный отбор	Может повышаться или понижаться	Повышено	Повышено	Повышена доля высокочастотного полиморфизма
Балансирующий отбор	Повышено	Может повышаться или понижаться	Снижено	Повышена доля полиморфизма средних частот

На рис. 7 представлены три филогенетических древа, отображающие эволюционные взаимоотношения между аллелями одного гена. Типичный

селективно нейтральный локус изображен слева, он имеет средний уровень нуклеотидного полиморфизма. Балансирующий отбор (в центре) поддерживает постоянный уровень низкочастотного полиморфизма, не приводящего к возникновению новых морфофизиологических адаптаций. Но для эволюционных биологов существенный интерес представляет движущий отбор, благоприятствующий сохранению полезных мутаций (Smith and Haigh, 1974). Движущий отбор фиксирует в популяции аллель, несущий полезную мутацию, повышающую индивидуальную приспособленность. Частота такого аллеля повышается под давлением отбора в панмиксической популяции постоянного размера (Stephan et al., 1992), что приводит к элиминации или снижению доли других аллелей гена (рис. 7).

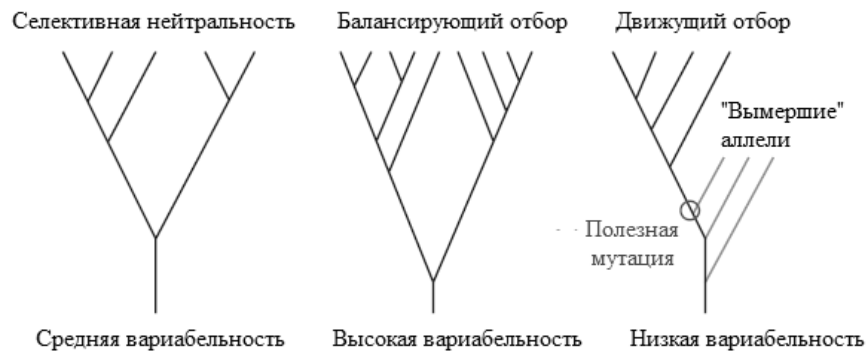


Рис. 7. Варианты эволюционных взаимоотношений между аллелями гена (адаптировано из Mitchell-Olds and Schmitt, 2006).

Существует множество методов детекции отбора, различающихся как по уровню анализируемых процессов (микро- и макроэволюционный), так и по типам используемых для анализа данных (внутривидовой полиморфизм, межвидовая дивергенция или их комбинация) (Nielsen, 2005; Vitti et al., 2013). Отбор на макроэволюционном уровне можно обнаружить с помощью тестов Хадсона-Крейтмана-Агуаде (НКА), МакДональда-Крейтмана (МК) и K_a/K_s . О влиянии отбора на аминокислотную последовательность белка говорит изменение числа несинонимичных мутаций на несинонимичный сайт (K_a) по сравнению с числом синонимичных мутаций на синонимичный сайт (K_s): негативный отбор снижает число несинонимичных замен, позитивный – увеличивает (Nielsen, 2005). Этот эффект сильнее проявляется на межвидовом уровне, чем внутри популяций одного

вида, что и используется в тестах НКА и МК для детекции влияния отбора на ген (McDonald and Kreitman, 1991; Hudson et al., 1987). Кроме того, соотношение K_a/K_s равняется 1 в отсутствие отбора, положительный отбор приводит к $K_a/K_s > 1$, отрицательный – к $K_a/K_s < 1$. На микроэволюционном уровне (внутри вида) применяются следующие тесты. Отбор изменяет генетическую структуру вида, повышая уровень дифференциации между популяциями, что может быть измерено с помощью индекса фиксации (F_{ST}) (Akey et al., 2002). На анализе распределения частот частот аллелей в популяции основан ряд тестов на нейтральность (Tajima, 1989; Fu and Li, 1993; Fay and Wu, 2000). Уровень неравновесия по сцеплению (LD), или корреляции между аллелями разных локусов, повышается под действием отбора (Kim and Nielsen, 2004), на этом принципе основано несколько статистических тестов (Hudson et al., 1994; Kelly, 1997; Depaulis and Veuille, 1998). Методы, позволяющие выявить следы действия отбора в геноме и идентифицировать локусы, претерпевшие направленное действие отбора, резюмированы в табл. 2 (Nielsen, 2005).

Таблица 2. Методы детекции отбора с помощью анализа последовательностей ДНК (адоптировано из Nielsen, 2005).

Тест	Исследуемый паттерн	Ссылки
Tajima's D, Fu and Li's D, Fay and Wu's H	Спектры аллельных частот	Tajima, 1989; Fu and Li, 1993; Fay and Wu, 2000
Тесты, основанные на LD	Неравновесие по сцеплению и/или структура гаплотипа	Hudson et al., 1994; Kelly, 1997
F_{ST} и подобные	Уровень подразделения популяции	в Vitalis et al., 2001; Akey et al., 2002
НКА	Число замен	Hudson et al., 1987
Macdonald-Kreitman	Число несинонимичных синонимичных замен	и McDonald and Kreitman, 1991
K_a/K_s	Число несинонимичных синонимичных замен	и Hughes and Nei, 1988

В реальных популяциях другие факторы, такие как перенос генов или изменение размера популяции, также влияют на аллельное разнообразие (Wright and Gaut, 2005). Используя данные только об одном локусе, статистические тесты часто не способны определить, являются ли различия между ожидаемым и наблюдаемым паттерном вариаций проявлением действия естественного отбора или лишь отражают демографическую историю популяции. Однако демографические процессы действуют одновременно на все локусы генома, в то

время как отбор действует только на определенные локусы. Таким образом, предполагаемое действие отбора на интересующий ген может быть выявлено с помощью сравнения разнообразия в целом по геному с характеристиками отдельного локуса или методом симуляции нестандартных популяционных моделей (Mitchell-Olds and Schmitt, 2006).

Таким образом, с помощью моделей молекулярной эволюции и популяционно-генетической теории можно описать, как отбор действовал на ген и выявить кандидатов на роль источников разнообразия между популяциями или видами (Luikart et al., 2003). Подобные исследования создают основу для эволюционных теорий, однако они должны быть дополнены функциональной характеристикой генов, контролирующей изучаемый признак: изучением влияния обнаруженных аллельных вариантов на экспрессию генов и функцию белкового продукта (Vitti et al., 2013). Работы по изучению молекулярной эволюции и филогении генов как *A.thaliana*, так и хозяйственно ценных растений, ведутся в ведущих российских и зарубежных лабораториях (Goryunova et al., 2012).

1.4.4. Внутривидовой полиморфизм по устойчивости к холоду *A. thaliana* и его генетические основы

Влияние температуры на биохимические и физиологические процессы оказывает определяющее значение на определение ареалов обитания и численности организмов. Работы по сравнению различных видов позволили выявить основные паттерны температурной адаптации. Но только изучение роли температуры в установлении тонких паттернов устойчивости в близкородственных видах или среди популяций одного вида даст представление о том, какова природа адаптивных вариаций по температурной устойчивости. Взаимосвязь условий окружающей среды с вариациями по устойчивости к различным температурам активно изучается на модельном объекте *A.thaliana*.

Внутривидовые различия могут быть связаны с разницей в индуцируемой холодом продукции метаболитов (Cook et al., 2004; Hannah et al., 2006), различиях в экспрессии генов при акклиматизации (Cook et al., 2004; Alonso-Blanco et al., 2005; Hannah et al., 2006).

1.4.4.1. Клиальная изменчивость по устойчивости к холоду

A. thaliana широко распространен в Северном полушарии: он охватывает регионы от экватора до Полярного круга. Расы отличаются значительным генетическим разнообразием, делая возможным изучение взаимодействия генотипа с окружающей средой (Koornneef et al., 2004; Mitchell-Olds and Schmitt 2006; Weigel, 2012). В частности, есть данные о клиальной изменчивости по различным признакам. Примеры: высотные клины по плодовитости (Montesinos-Navarro et al. 2011), времени зацветания (Méndez-Vigo et al. 2011) широтные клины по времени зацветания (Stinchcombe et al. 2004), размеру растения и скорости роста (Li et al., 1998), скорости роста гипокотыля (Stenoien et al., 2002), длине циркадного периода (Michael et al., 2003), чувствительности к яровизации (Stinchcombe et al., 2005). Широтные клины являются следствием изменения таких факторов внешней среды, как свет, температура и количество осадков, с широтой (Weigel, 2012).

Существует значительное разнообразие между расами *A.thaliana* по устойчивости к холоду и способности к акклиматизации, которое может быть использовано для исследования молекулярных основ этих процессов. Клиальная изменчивость *A.thaliana* по устойчивости к холоду изучалась разными исследователями на различных коллекциях рас *A.thaliana* (Lin et al. 2008; McKhann et al. 2008; Zhen and Ungerer 2008a; Zhen and Ungerer 2008b; Zuther et al., 2012). В работе Zhen и Ungerer, была изучена устойчивость к холоду 71 рас *A.thaliana*, собранных из различных частей ареала вида в двух сериях экспериментов: без холодной акклиматизации и после холодной акклиматизации (Zhen and Ungerer, 2008b). Линейная зависимость устойчивости к холоду от широты происхождения рас без или после предварительной холодной акклиматизации (рис. 8) говорит о наличии широтного клина по устойчивости. Для подтверждения того, что различия по устойчивости к холоду между расами связаны не просто с широтой происхождения, но, главным образом, с различиями в температурных условиях, был проведен регрессионный анализ, показавший, что существует связь между средними температурами января и июля и широтой, для которой наблюдались эти температуры (Zhen and Ungerer, 2008a). В работе Zuther et al. по изучению 54 рас подтвердился обнаруженный ранее широтный клин по устойчивости к холоду (рис. 9) и была выявлена также взаимосвязь долготы произрастания с устойчивостью

(Zuther et al., 2012). Также подтвердилось высказанное ранее предположение, что именно локальные адаптации к определенному климату, а не генетическое родство между популяциями, являются определяющими в отношении холодовой устойчивости популяций (Fournier-Level et al. 2011; Hancock et al. 2011). Таким образом, доказана взаимосвязь устойчивости к холоду и широты произрастания расы.

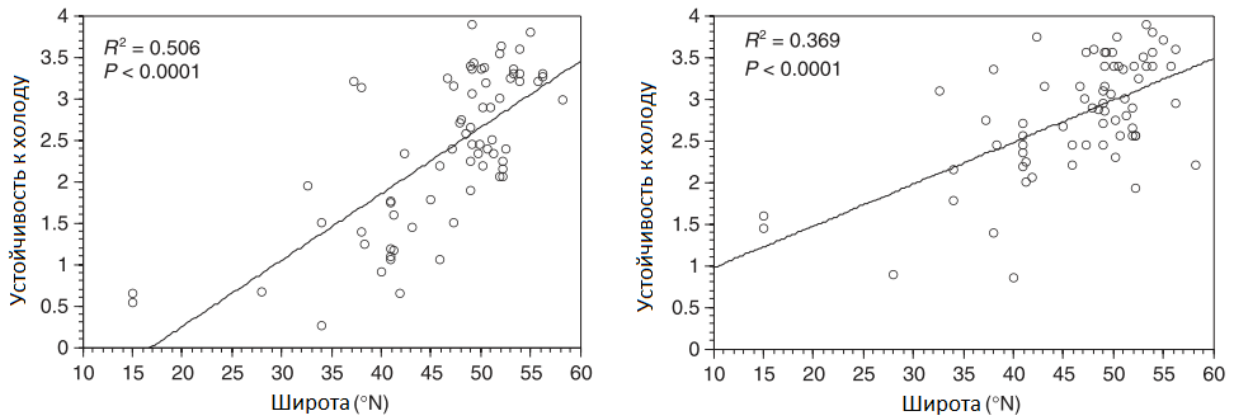


Рис. 8. Показатели устойчивости к холоду коррелируют с широтой происхождения рас: (А) Растения подвергались действию -10°C после предварительной холодной акклиматизации, (Б) Без акклиматизации. По оси абсцисс отложена широта происхождения, по оси ординат – индекс устойчивости к холоду (адаптировано из Zhen and Ungerer, 2008б).

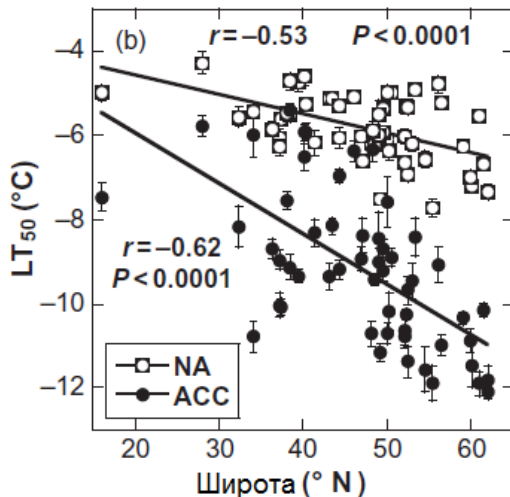


Рис. 9. Корреляционный анализ значений LT_{50} (температуры, при которой происходит утечка 50% электролитов) для неакклиматизированных (NA) и акклиматизированных (ACC) растений с широтой региона происхождения расы (адаптировано из Zuther et al., 2012).

1.4.4.2. Роль генов регулона *CBF* в формировании внутривидовых различий по устойчивости к холоду *A.thaliana*

Ключевыми факторами, обуславливающими внутривидовые различия, являются гены регулона *CBF* (*CBF1*, 2, 3 и их гены-мишени *COR*), а также

некоторые метаболиты. Растения из регионов с более суровым климатом характеризовались также повышенным содержанием растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сахарозы и раффинозы) и пролина (Zuther et al., 2012). Роль генов регулона *CBF* в формировании внутривидовых различий по устойчивости к холоду доказана с помощью различных методов.

Картирование локусов количественных признаков (QTL)

Внутривидовые различия по устойчивости к холоду между расой *Cvi* (тропические Острова Зеленого Мыса) и *Ler* (Северная Европа) были использованы для поиска QTL, контролирующей устойчивость к холоду. Показано, что растения этих рас имеют различную устойчивость к холоду как до, так и после акклиматизации. Картирование позволило выявить несколько «QTL холодоустойчивости» (FREEZING TOLERANCE QTL или FTQ). Один из них, FTQ4, обладающий наибольшим влиянием на исследуемый признак, был локализован с тандемным кластером генов *CBF1-3* (Alonso-Blanco et al., 2005). Пониженная устойчивость к холоду растений расы *Cvi* оказалась связанной с делецией в промоторной области гена *CBF2*, приводящей к снижению экспрессии этого гена и его генов-мишеней. Это предположение было подтверждено с помощью теста на межallelную комплементацию: аллель гена *CBF2* из расы *Ler* повышает устойчивость к холоду трансгенных растений расы *Cvi* (Alonso-Blanco et al., 2005).

Эти данные подтвердились и в недавнем исследовании методом картирования QTL монофилетической группы популяций *A.thaliana* из долины реки Янцзы в Китае. Исследователи установили, что в основе различий между популяциями по устойчивости к холоду лежит полиморфизм в локусе, содержащем гены *CBF*. Кроме того, было выявлено выраженное действие естественного отбора на последовательность гена *CBF2* в более устойчивых популяциях. Чувствительные к холоду популяции содержали инсерцию в гене *CBF2*, приводящую к образованию нефункционального белка (Kang et al., 2013).

Анализ экспрессии генов, контролирующей устойчивость к холоду

В исследовании девяти рас *A.thaliana*, происходящих из разных регионов от Скандинавии до Островов Зеленого Мыса, было обнаружено, что с устойчивостью

к холоду коррелирует содержание ряда метаболитов, а также уровень экспрессии ряда генов, в том числе ТФ. Повышенная устойчивость к холоду связана с ингибированием фотосинтеза, индукции флавоноидного метаболизма и гормональными сигналами в устойчивых северных расах. Получены также данные о том, что в устойчивости северных рас к холоду могут играть гены регулонов *CBF* и *ZAT12* (Hannah et al., 2006).

В ходе анализа 48 линий *A.thaliana* McKhann et al. обнаружили, что растения рас, обладающих наибольшей устойчивостью к холоду, имеют более высокий уровень экспрессии генов *CBF* и *COR* под действием холода, чем растения чувствительных к холоду рас из южных регионов ареала. Однако они наблюдали также и исключения из этой общей тенденции, что говорит о том, что в ответ на холодовой стресс вовлечены также и многие другие генетические пути, и гены *CBF* регулона не могут объяснить все различия в устойчивости (McKhann et al., 2008). Несмотря на установление неких общих правил, обуславливающих различия в устойчивости к холоду между расами, не было установлено четкой корреляции между уровнем экспрессии этих генов, полиморфизмом их последовательностей и устойчивостью к холоду рас. Недавнее исследование 54 рас *A.thaliana* не выявило корреляции уровня относительной экспрессии генов *CBF1-3* с устойчивостью к холоду, однако уровень экспрессии генов *COR* (*COR6.6*, *COR15A*, *COR78*) и транскрипционного фактора *ZAT6* коррелирует с географическим происхождением расы и с уровнем устойчивости (Zuther et al., 2012). Исследование 48 линий также не выявило взаимосвязи уровня экспрессии генов *CBF* с устойчивостью расы к холоду (Gery et al., 2011).

Анализ действия отбора на гены устойчивости к холоду

О значимости определенных генов для развития приспособленности к холоду определенных рас можно судить по тому, какое влияние оказывал отбор на их нуклеотидные последовательности в ходе эволюции. Три группы исследователей независимо и практически одновременно пришли к выводу, что в различиях по устойчивости к холоду между расами *A.thaliana* разных широт определенную роль могли сыграть разные селективные силы, действующие на гены семейства *CBF* (Lin et al., 2008; McKhann et al., 2008; Zhen and Ungerer, 2008a) Показано, что в

южных, чувствительных к холоду расах *A.thaliana* гены семейства *CBF* накопили большое число редких полиморфизмов в кодирующей части последовательности, приводящих к аминокислотным заменам в соответствующих белках. Это может говорить о том, что негативный отбор оказывал небольшое влияние на эволюцию этих генов в более теплой части ареала *A.thaliana* (McKhann et al., 2008). В низких широтах, характеризующихся более теплым климатом, больше вероятность накопления в популяции нуклеотидного полиморфизма по генам *CBF* как в кодирующей, так и в регуляторной участках последовательности. Сильное действие очистительного отбора зафиксировано в более северных, устойчивых к холоду расах *A.thaliana* (Lin et al., 2008; Zhen and Ungerer, 2008a). На связь давления отбора на гены *CBF* с холодовой устойчивостью растений определенной расы указывают и данные Kang et al. (Kang et al., 2013).

Пониженная устойчивость к холоду рас, обитающих в регионах с мягким климатом, вкупе с их низкой способностью к акклиматизации наводит на мысль о том, что растение затрачивает значительные энергетические и материальные ресурсы на развитие устойчивости. Очевидно, что активация экспрессии большого числа генов и выработка метаболитов требуют значительных ресурсов (Cook et al., 2004; Hannah et al., 2006; Vogel et al., 2005). Изучение трансгенных растений *A.thaliana*, суперэкспрессирующих гены семейства *CBF/DREB1* служит подтверждением этой теории. Обнаружено, что такие растения обладают пониженным ростом, заторможены в развитии и менее плодовиты, чем растения дикого типа (Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2000). Предположительно, ресурсы растения, в норме расходуемые на рост и репродукцию, направляются на развитие акклиматизации. Необходимо отметить, что подобные эффекты наблюдались не всегда (Jackson et al., 2004).

Эти наблюдения привели к двум возможным объяснениям причин накопления несинонимичных замен в последовательности генов *CBF* в расах из южных регионов: а) мутации, вызывающие нефункциональность генов холодовой акклиматизации могут накапливаться в таких популяциях случайно и быть селективно нейтральными; б) такие мутации находятся под положительным влиянием естественного отбора, так как позволяют избегать негативного влияния повышенной активности генов холодового ответа. Однако исследование с

использованием ряда трансгенных линий и природных рас *A.thaliana* показало, что более вероятен первый вариант (Zhen et al., 2011).

1.5. Заключение

Анализ литературных источников показывает, что проблеме генетического контроля устойчивости растений к холоду уделяется большое внимание исследователями всего мира. Идентифицировано множество генных семейств и путей регуляции этого процесса. Значительный прогресс был достигнут благодаря изучению модельного генетического объекта *A.thaliana*. Исследования по устойчивости к холоду ряда рас *A.thaliana* продемонстрировали значительные различия между расами и выявили клинальную изменчивость по этому признаку, связанную с географической широтой и температурой. Тем не менее, остаются не выясненными такие вопросы, как специфичные механизмы регуляции ответа на холод в различных тканях растения и на различных стадиях развития. Известно, что многие ТФ обладают плейотропным действием, обеспечивая взаимосвязь между различными процессами развития и физиологии растения. В то же время, возможна и специализация действия каких-либо ТФ и их мишеней, развившаяся в ходе коэволюции. Основным механизмом возникновения таких специфично действующих механизмов является дупликация гена с последующей дивергенцией его функций от предкового гена. Недавно идентифицированный гомолог гена *ICE1* ген *ICE2*, кодирующий ТФ, участвующий в регуляции холодового ответа, представляет интересный в этом отношении объект исследования. Использование трансгенных растений, а также природных рас *A.thaliana* и последовательностей гомологов гена из других видов растений позволят подробно изучить роль гена *ICE2* в ответе на холод, установить, какие дополнительные функции он выполняет в организме и какие эволюционные процессы привели к возникновению и специализации гена.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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 2 трансгенные линии *A.thaliana Super-Half2-ICE2*, полученные из ИОГен РАН (табл. 3). Семена стерилизовали смесью 70% спирта и перекиси водорода 5% в течение 3 минут и яровизировали при 4°C в темноте в течение 2-х дней. Растения выращивались в асептических условиях на агаризованной среде Квитко (Квитко, 1960), или в смеси почвы и вермикулита (2:1) при 14 - 16-часовом фотопериоде (длинный день) в условиях теплицы, при интенсивности освещения 100 мЕ и температуре 22-25°C. Для акклиматизации двухнедельные растения, выращенные в асептической культуре, помещали на сутки на 4°C при постоянном свете 100 мЕ.

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

Название	Источник
Col-M (Columbia), лабораторная линия К-8	Коллекция кафедры генетики МГУ
Dj-M (Dijon), лабораторная линия К-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

2.2. Получение гомозиготных линий трансгенных растений с суперэкспрессией гена *ICE2*

Трансгенные линии *A.thaliana*, суперэкспрессирующие ген *ICE2*, были созданы в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН под руководством д.б.н, профессора В.А. Тарасова методом трансформации неопыленных бутонов растений расы Columbia генетической конструкцией, содержащей ген *ICE2* под

контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Для селекции трансформантов в конструкцию был введен ген фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы *bar* из *Streptomyces hygrosopicus*, обуславливающий устойчивость к гербициду фосфинотрицину (“Basta”). Профессором В.А. Тарасовым нам были предоставлены семена растений поколения T2 двух независимых линий *Super-Half2-ICE2*. Так как ранее в поколении T2 были получены трансгенные линии с моногенным характером наследования, т.е. растения оказались гетерозиготны по вставке генетической конструкции (Fursova et al., 2009), то была поставлена цель отобрать для дальнейшего изучения линии, не дающие расщепления в потомстве, т.е. гомозиготные по инсерции. Для этого на первом этапе нами было исследовано расщепление на устойчивость к “Basta” в поколении T3: среди 15 семей двух линий были отобраны 8 гомозиготных семей. Характер наследования определяли методом χ^2 (Приложение, табл. 1). Выращенные в почве проростки были обработаны водным раствором гербицида с концентрацией 250 мг/л, через неделю после обработки подсчитывалось число выживших растений. Затем для подтверждения наличия инсерции были выбрано по 1 семье в каждой из линий поколения T4. Методом ОТ-ПЦР была подтверждена повышенная экспрессия изучаемого гена в трансгенных растениях по сравнению с растениями ДТ по отношению к стабильной экспрессии контрольного гена. На заключительном этапе из поколения T5 этих линий были отобраны независимые гомозиготные линии D7 и D14.

2.3. Физиологический тест на устойчивость к холоду

Применялся тест на замораживание из Xin et al., 2007, с изменениями. 10-дневные проростки, выращенные на агаризованной среде Квитко, были подвергнуты акклимации при 4°C в течение 10 дней. Затем чашки с растениями и добавленными чешуйками льда выдерживались в течение 16 часов при -1°C в темноте и в течение 20 часов при -5°C. После замораживания растения помещались на 12 часов при 4°C в темноту и переносились в стандартные условия теплицы. Выживаемость растений оценивалась визуально через 5 дней.

2.4. Сканирующая электронная микроскопия

Участки полностью раскрывшихся розеточных листьев фиксировали в растворе 4% глутаральдегида в 0.025 М фосфатном буфере (300 мг $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 100 мл воды), pH 7.0, при 4°C в течение 18 часов, затем инкубировали при 4°C в 2% OsO_4 в течение 12 часов, 3 раза промывали фосфатным буфером, обезживали серией спиртов (30%, 50%, 70% и 80% - по 10-15 минут, 96% - 2 раза по 30 минут), затем инкубировали в 100% ацетоне в течение часа. 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). Ширину устьичной апертуры измеряли у 50 устьиц. Плотность расположения устьиц (stomata density, SD) и эпидермальных клеток (epidermal cell density, ED) рассчитывали как отношение числа устьиц и эпидермальных клеток, соответственно, к общему числу клеток. Устьичный индекс (stomata index, SI) рассчитывали по формуле $\text{SI} [\%] = ((\text{SD})/(\text{SD} + \text{ED})) \cdot 100$ (Pino et al., 2008). По три независимых фотографии поверхности листа с каждой линии (по 1 мм²) были использованы для подсчета SD, ED и SI.

2.5. Молекулярные методы

Выделение ДНК

Геномную ДНК для анализа нуклеотидных последовательностей аллелей *ICE1* и *ICE2* выделяли, используя метод Dellaporta et al., 1983 с модификациями. Навески ткани 50-150 мг растирали в жидком азоте в фарфоровой ступке, переносили в микропробирку Eppendorf. Добавляли 500 мкл TES-буфера (100мМ Tris/HCl (pH 8,0); 10мМ ЭДТА; 2% додецилсульфат Na). Инкубировали 45 мин. при 60°C. Добавляли 0,2 объема 5М NaCl и 0,1 объема 10% ЦТАБ. Инкубировали 10 мин. при 65°C. Добавляли 0,75 объема смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), перемешивали. Центрифугировали 10 мин. при 14 000 g. Верхнюю фракцию переносили в новую пробирку, добавляли 1 объем 96% этанола. Осаждали не менее 2-х часов при -20°C. Центрифугировали 30 мин при 14000g, жидкость сливали и промывали осадок 70% этанолом. Осадок высушивали и растворяли в деионизованной воде.

Выделение РНК

РНК для анализа экспрессии выделяли из пула двухнедельных розеток (~10 растений), выращенных в асептической культуре, с помощью RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) и обрабатывали ДНазой (Qiagen, США) по методике производителя. Целостность выделенной РНК проверяли на электрофорезе в 1% агарозном геле. Количество РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Scientific, США).

Синтез первой цепи кДНК

Первую цепь кДНК синтезировали с помощью реактивов и протокола фирмы “Силекс” в объеме 20 μ л. Полученную кДНК разбавляли до конечной концентрации кДНК в растворе 12,5 нг/ μ л.

Анализ относительной экспрессии генов

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили 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) и 1,5 μ л кДНК в реакционном объеме 15 μ л. Последовательности праймеров брали из литературных источников или подбирали при помощи программы Primer 3 таким образом, чтобы в реакцию вступала только кДНК, список праймеров приведен в табл. 4. Синтез праймеров заказывали в фирме Евроген (Россия). Для амплификации была использована следующая программа: 1 цикл 10 мин при 95°C; 40 циклов 15 с при 95°C, 1 мин при 60°C. Специфичность амплификации была проверена с помощью анализа кривой плавления и визуализации продуктов в агарозном геле. Анализ относительного содержания транскриптов проводили по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) путем нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов, используя две биологические и три технические повторности. Рассчитывалась разница значений C_t (ΔC_t) между целевым и референсными генами, затем сравнивались значения C_t контрольного и опытного образцов. В качестве референсных были использованы гены *PP2A* и *At5g46630*, которые характеризуются конститутивной экспрессией (Czechowski et al., 2005).

Электрофорез в агарозном геле

Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 1 или 1,5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия (0,1мг/мл). Была использована электрофоретическая камера для горизонтального электрофореза производства фирмы «Хеликон» (Россия). Электрофорез проводили в буфере TBE (100 мМ Tris / HCl pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 2% SDS).

Секвенирование

Последовательности генов *ICE1* и *ICE2* были амплифицированы как два перекрывающихся сегмента с использованием реактивов для проведения ПЦР и Encyclo полимеразы (Евроген, Россия), последовательности использованных праймеров приведены в табл. 4. Продукты ПЦР были визуализированы в 1,5% агарозном геле, элюция фрагментов проводилась с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование ДНК проводили в ЦКП “Геном”. Полиморфные сайты были проверены визуально на хроматограммах и подтверждены с помощью сравнения прямых и обратных ридов.

2.6. Методы биоинформатики

Анализ полиморфизма и филогении генов

Для реконструкции филогении генов *ICE1* и *ICE2 A.thaliana* потенциальные ортологи их белковых продуктов были идентифицированы путем поиска гомологичных белковых последовательностей в базах данных транслированных генов 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>), используя параметры по умолчанию. Последовательности с E-value $\leq 1e-05$ были использованы, избыточные последовательности были удалены. Список последовательностей приведен в табл. 5.

Таблица 4. Использованные в работе праймеры.

Ген	Название праймера	Назначение	Последовательность	Источник
<i>ICE1</i>	ICE1-1f	Секвенирование	5'-TGTGCAAATGTTTTGTCTGTCTT-3'	Primer 3
	ICE1-1r	Секвенирование	5'-GGTGGTTTTGTTGGGAACAG-3'	Primer 3
	ICE1-2f	Секвенирование	5'-CCTCCTCCTCCAATCTGAAC-3'	Primer 3
	ICE1-2r	Секвенирование	5'-TGACGGTGAGAGAGAGAGAGA-3'	Primer 3
	ICE1-f	ПЦР-РВ	5'-CCCATTAAAACAGCTGATCACA-3'	Primer 3
	ICE1-r	ПЦР-РВ	5'-CCAGCAAGCTAGAGTTGAGGTT-3'	Primer 3
<i>ICE2</i>	ICE2-1F	Секвенирование	5'-TTTGATTATTAACGGTCGGATT-3'	Primer 3
	ICE2-1R	Секвенирование	5'-TCGTCAATCTCTCTCTCGTAGC -3'	Primer 3
	ICE2-2F	Секвенирование	5'-GCTCGCAGCCAACTCTGTT-3'	Primer 3
	ICE2-2R	Секвенирование	5'-AGCCTTTTCTCATGACAGACTC -3'	Primer 3
	ICE2-f	ПЦР-РВ	5'-TAAAGGCCAACAACCAAGAGTT-3'	Primer 3
	ICE2-r	ПЦР-РВ	5'-TAATCACCGCTTGTTGAACATC-3'	Primer 3
<i>CBF1</i>	CBF1-F	ПЦР-РВ	5'-GGAGACAATGTTTGGGATGC-3'	Lin et al., 2008
	CBF1-R	ПЦР-РВ	5'-CGACTATCGAATATTAGTAACTCC-3'	Lin et al., 2008
<i>CBF2</i>	CBF2-F	ПЦР-РВ	5'-CGACGGATGCTCATGGTCTT-3'	Lin et al., 2008
	CBF2-R	ПЦР-РВ	5'-TCTTCATCCATATAAAACGCATCTTG-3'	Lin et al., 2008
<i>CBF3</i>	CBF3-F	ПЦР-РВ	5'-TTCCGTCCGTACAGTGGAAAT-3'	Lin et al., 2008
	CBF3-R	ПЦР-РВ	5'-AACTCCATAACGATACGTCGTC-3'	Lin et al., 2008
<i>COR15a</i>	COR15a-F	ПЦР-РВ	5'-GAAAAAAACAGTGAAACCGCAGAT-3'	Lin et al., 2008
	COR15a-R	ПЦР-РВ	5'-CCACATACGCCGCAGCTT-3'	Lin et al., 2008
<i>COR47</i>	COR47-F	ПЦР-РВ	5'-ACAAGCCTAGTGTCATCGAAAAGC-3'	McKhann et al., 2008
	COR47-R	ПЦР-РВ	5'-TCTTCATCGCTCGAAGAGGAAG-3'	McKhann et al., 2008
<i>COR78</i>	COR78-F	ПЦР-РВ	5'-GCACCAGGCGTAACAGGTAAC-3'	McKhann et al., 2008
	COR78-R	ПЦР-РВ	5'-AAACACCTTTGTCCCTGGTGG-3'	McKhann et al., 2008
<i>SFR6/MED16</i>	SFR6-F	ПЦР-РВ	5'-TTGTGCCGTAACCTCAGTGC-3'	Primer 3
	SFR6-R	ПЦР-РВ	5'-GTATTTGCCTTGGAGCTTGG-3'	Primer 3
<i>MED2</i>	MED2-F	ПЦР-РВ	5'-AGCTACACCAGAGCCACGTT-3'	Primer 3
	MED2-R	ПЦР-РВ	5'-TCTCCCTCCCATTAGTGCAG-3'	Primer 3
<i>MED14</i>	MED14-F	ПЦР-РВ	5'-TCTTTGTCCGGTGGCTATGTG-3'	Primer 3
	MED14-R	ПЦР-РВ	5'-CCATTTTGTGTGCTTGGTG-3'	Primer 3

<i>ABA1</i>	ABA1-F	ПЦР-РВ	5'-GGCATTGTTGGTCTAAGGTGAGAA-3'	Barrero et al., 2006
	ABA1-R	ПЦР-РВ	5'-CAGACTCGATATCCGCTGGTA-3'	Barrero et al., 2006
<i>CYP707A2</i>	CYP707A2-f	ПЦР-РВ	5'-AAATGGAGTGCATCATGTC-3'	Primer 3
	CYP707A2-r	ПЦР-РВ	5'-CCTTCTTCATCTCCAATCAC-3'	Primer 3
<i>RD29B</i>	RD29B-f	ПЦР-РВ	5'-GAACCAATCAGAATTCACCATCCA-3'	Primer 3
	RD29B-r	ПЦР-РВ	5'-AGAGCATCATGAGAAGG-3'	Primer 3
<i>RAB18</i>	RAB18-F	ПЦР-РВ	5'-ATCCAGCAGCAGTATGACGAGT-3'	Nishimura et al., 2004
	RAB18-R	ПЦР-РВ	5'-ACCGGGAAGCTTTTCTTGATC-3'	Nishimura et al., 2004
<i>ADH</i>	ADH-F	ПЦР-РВ	5'-AGCTGCTGTGGCATGGGA-3'	Primer 3
	ADH-R	ПЦР-РВ	5'-TCTGCGGTGGAGCAACCT-3'	Primer 3
<i>NCED3</i>	NCED3-f	ПЦР-РВ	5'-CGGTGGTTTACGACAAGAACAA-3'	Barrero et al., 2006
	NCED3-r	ПЦР-РВ	5'-CAGAAGCAATCTGGAGCATCAA-3'	Barrero et al., 2006
<i>RD22</i>	RD22-F	ПЦР-РВ	5'-ATGGCGATTCGTCTTCC-3'	Primer 3
	RD22-R	ПЦР-РВ	5'-TAAATCGGTCTTCCCTTGTG-3'	Primer 3
<i>FLC</i>	FLC-f	ПЦР-РВ	5'-GATTTGTCCAGCAGGTGACATCTC-3'	Primer 3
	FLC-r	ПЦР-РВ	5'-TTCTCCAAACGTGCAACGGTCTC-3'	Primer 3
<i>SOC1</i>	SOC1-f	ПЦР-РВ	5'-GCCTTTGAGCTCTCAGTGCTTTG-3'	Kendall et al., 2011
	SOC1-r	ПЦР-РВ	5'-CTTCGCTTTCATGAGATCCCCAC-3'	Kendall et al., 2011
<i>PP2A</i>	PP2A-F	ПЦР-РВ	5'-TGGCCAAAATGATGCAATCTCT-3'	Baron et al., 2012
	PP2A-R	ПЦР-РВ	5'-AAGCATGGCCGTATCATGTTCT-3'	Baron et al., 2012
<i>At5g46630</i>	At5g46630-F	ПЦР-РВ	5'-TCGATTGCTTGGTTTGGAAAGAT-3'	Czechowski et al., 2005
	At5g46630-R	ПЦР-РВ	5'-GCACTTAGCGTGGACTCTGTTTGATC-3'	Czechowski et al., 2005

Таблица 5. Белковые последовательности, использованные для филогенетического анализа.

Название на дендрограмме	Аннотированное название из БД	Источник
Thellungiella halophila ICE1	tr D7R822 D7R822_THEHA Inducer of CBF expression 1 OS=Thellungiella halophila GN=ICE1 PE=4 SV=1	GenBank
Thellungiella salsuginea ICE-like protein	tr D2DHG7 D2DHG7_THESL ICE-like protein OS=Thellungiella salsuginea PE=2 SV=1	GenBank
Eutrema halophilum ICE1	gi 296881976 gb ADH82413.1 inducer of CBF expression 1 [Eutrema halophilum]	GenBank
Isatis tinctoria ICE1	gi 381415424 gb AFG29442.1 inducer of CBF expression 1 protein [Isatis tinctoria]	GenBank
Brassica rapa ICE1	gi 172053609 gb ACB70963.1 ICE1 [Brassica rapa subsp. chinensis]	GenBank
Brassica juncea ICE1	tr I6LU61 I6LU61_BRAJU Inducer of CBF expression 1 OS=Brassica juncea GN=ICE1 PE=2 SV=2	UniProt
Brassica napus ICE1	gi 342731393 gb AEL33687.1 ICE1 [Brassica napus]	GenBank
Capsella bursa-pastoris ICE1	gi 45934582 gb AAS79350.1 inducer of CBF expression 1 protein [Capsella bursa-pastoris]	GenBank
Capsella rubella Carubv10017099m	>Crubella Carubv10017099m.g Carubv10017099m	Phytozome
Arabidopsis thaliana ICE1	sp Q9LSE2 ICE1_ARATH Transcription factor ICE1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SCRM PE=1 SV=1	UniProt
Arabidopsis lyrata 484449	>Alyrata 484449 484449	Phytozome
Brassica rapa Bra032947	Brapa Bra032947 Bra032947	Phytozome
Raphanus sativus ICE1	gi 324983869 gb ADY68771.1 inducer of CBF expression 1 protein [Raphanus sativus]	GenBank
Brassica rapa Bra034246	Brapa Bra034246 Bra034246	Phytozome
Brassica rapa Bra019794	Brapa Bra019794 Bra019794	Phytozome
Brassica rapa Bra016749	Brapa Bra016749 Bra016749	Phytozome
Thellungiella halophila Thalv10007566m	Thalophila Thhalv10007566m.g Thhalv10007566m	Phytozome
Arabidopsis thaliana ICE2	sp Q9LPW3 SCRM2_ARATH Transcription factor SCREAM2 OS=Arabidopsis thaliana GN=SCRM2 PE=1 SV=1	UniProt
Capsella rubella v10009081mg	gi 482576166 gb EOA40353.1 hypothetical protein CARUB_v10009081mg [Capsella rubella]	GenBank
Arabidopsis lyrata 911072	Alyrata 911072 911072	Phytozome
Vitis vinifera ICE1	gi 385251598 gb AFI49627.1 inducer of CBF expression 1 [Vitis vinifera]	GenBank
Carica papaya evm.TU.supercontig_70.77	Cpapaya evm.TU.supercontig_70.77 evm.model.supercontig_70.77	Phytozome
Eucalyptus globulus ICE1	gi 333470596 gb AEF33833.1 ICE transcription factor 1 [Eucalyptus globulus]	GenBank
Eucalyptus camaldulensis ICE1	gi 324983879 gb ADY68776.1 inducer of CBF expression 1 protein [Eucalyptus camaldulensis]	GenBank
Eucalyptus grandis Eucgr.G01938	Egrandis Eucgr.G01938 Eucgr.G01938.1	Phytozome
Aquilegia coerulea Aquca 100 00035	Acoerulea Aquca_100_00035 Aquca_100_00035.1	Phytozome
Vitis riparia ICE1	gi 455475496 gb AGG34703.1 inducer of CBF expression 1 [Vitis riparia]	GenBank
Vitis amurensis ICE14	gi 324103763 gb ADY17816.1 ICE14 [Vitis amurensis]	GenBank
Picea sitchensis D5A934	tr D5A934 D5A934_PICSI Putative uncharacterized protein OS=Picea sitchensis PE=2 SV=1	UniProt
Poncirus trifoliata BHLH	tr K9NBJ4 K9NBJ4_PONTR BHLH OS=Poncirus trifoliata PE=2 SV=1	UniProt
Citrus clementine Ciclev10015052m	Cclementina Ciclev10015052m.g Ciclev10015052m	Phytozome
Medicago truncatula gb AFK36041	gi 388495950 gb AFK36041.1 unknown [Medicago truncatula]	GenBank
Cicer arietinum ICE1-like	gi 502106825 ref XP_004493068.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like isoform X1 [Cicer arietinum]	GenBank
Lotus japonicus BHLH23	tr C0JP29 C0JP29_LOTJA Putative basic helix-loop-helix protein BHLH23 OS=Lotus japonicus PE=4 SV=1	UniProt
Glycine max ICE1	gi 351723481 ref NP_001238560.1 inducer of CBF expression 1 [Glycine max]	GenBank
Glycine max ICE2	gi 351723971 ref NP_001238577.1 inducer of CBF expression 2 [Glycine max]	GenBank

Glycine max ICE3	gi 351724377 ref NP_001238591.1 inducer of CBF expression 3 [Glycine max]	GenBank
Glycine max ICE4	gi 351727749 ref NP_001238707.1 inducer of CBF expression 4 [Glycine max]	GenBank
Glycine max ICE5	gi 213053820 gb ACJ39215.1 inducer of CBF expression 5 [Glycine max]	GenBank
Glycine max ICE6	gi 213053822 gb ACJ39216.1 inducer of CBF expression 6 [Glycine max]	GenBank
Lactuca sativa ICE1	gi 323482034 gb ADX86750.1 inducer of CBF expression 1 protein [Lactuca sativa]	GenBank
Chrysanthemum dichroum ICE1	gi 346722062 gb AEO50748.1 ICE1 [Chrysanthemum dichroum]	GenBank
Phaseolus vulgaris Phvul.009G162000	Pvulgaris Phvul.009G162000 Phvul.009G162000.1	Phytozome
Linum usitatissimum Lus10032542	Lusitatissimum Lus10032542.g Lus10032542	Phytozome
Mimulus guttatus mgv1a004396m	Mguttatus mgv1a004396m.g mgv1a004396m	Phytozome
Solanum lycopersicum ICE1	gi 460392085 ref XP_004241648.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like [Solanum lycopersicum]	GenBank
Solanum tuberosum M1CT37	tr M1CT37 M1CT37_SOLTU Uncharacterized protein OS=Solanum tuberosum GN=PGSC0003DMG401028788 PE=4 SV=1	UniProt
Cucumis sativus ICE1-like	gi 449454802 ref XP_004145143.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like [Cucumis sativus]	GenBank
Camellia sinensis ICE	gi 399145795 gb AFP25102.1 ICE1 [Camellia sinensis]	GenBank
Malus domestica bHLH	gi 302398593 gb ADL36591.1 BHLH domain class transcription factor [Malus x domestica]	GenBank
Prunus persica gb EMJ11175	gi 462405711 gb EMJ11175.1 hypothetical protein PRUPE_ppa005038mg [Prunus persica]	GenBank
Fragaria vesca ICE-like	gi 470122941 ref XP_004297495.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	GenBank
Corylus heterophylla ICE-like	gi 325976998 gb ADZ48234.1 ICE-like protein [Corylus heterophylla]	GenBank
Gossipium raimondii Goraj.007G044800	Graimondii Gorai.007G044800 Gorai.007G044800.1	Phytozome
Theobroma cacao Thecc1EG014741	Tcacao Thecc1EG014741 Thecc1EG014741t1	Phytozome
Citrus sinensis orange1.1g047004m	Csinensis orange1.1g011370m.g orange1.1g011370m	Phytozome
Populus trihocarpa ICE1	gi 125863280 gb ABN58427.1 inducer of CBF expression 1 [Populus trihocarpa]	GenBank
Ricinus communis ICE1	gi 255540073 ref XP_002511101.1 Transcription factor ICE1, putative [Ricinus communis]	GenBank
Manihot esculenta cassava4.1 005158m	Mesculenta cassava4.1_005158m.g cassava4.1_005158m	Phytozome
Musa AB Group ICE1-1	gi 449811523 gb AGF25259.1 inducer of CBF expression 1-1 [Musa AB Group]	GenBank
Musa AB Group ICE1-2	gi 449811525 gb AGF25260.1 inducer of CBF expression 1-2 [Musa AB Group]	GenBank
Musa AB Group ICE1-3	gi 449811527 gb AGF25261.1 inducer of CBF expression 1-3 [Musa AB Group]	GenBank
Musa AB Group ICE1-4	gi 449811529 gb AGF25262.1 inducer of CBF expression 1-4 [Musa AB Group]	GenBank
Musa AB Group ICE1-5	gi 449811531 gb AGF25263.1 inducer of CBF expression 1-5 [Musa AB Group]	GenBank
Musa AB Group ICE1-6	gi 449811533 gb AGF25264.1 inducer of CBF expression 1-6 [Musa AB Group]	GenBank
Sorghum bicolor Sb06g032208	tr C5YA30 C5YA30_SORBI Putative uncharacterized protein Sb06g032280 OS=Sorghum bicolor GN=Sb06g032280 PE=4 SV=1	UniProt
Brachypodium distachyon ICE-like	gi 357152141 ref XP_003576023.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like [Brachypodium distachyon]	GenBank
Sorghum bicolor Sb05g019530	gi 242068603 ref XP_002449578.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_05g019530 [Sorghum bicolor]	GenBank
Zea mays HLH	gi 413920949 gb AFW60881.1 putative HLH DNA-binding domain superfamily protein [Zea mays]	GenBank
Panicum virgatum Pavirv00068969m	Pvirgatum Pavirv00068969m.g Pavirv00068969m	Phytozome
Oryza sativa Osl 36299	gi 218185838 gb EEC68265.1 hypothetical protein OsL_36299 [Oryza sativa Indica Group]	GenBank
Aegilops tauschii ICE1	gi 475567554 gb EMT15292.1 Transcription factor ICE1 [Aegilops tauschii]	GenBank

Hordeum vulgare M0Z4F3	tr M0Z4F3 M0Z4F3_HORVD Uncharacterized protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=4 SV=1	UniProt
Triticum aestivum ICE87	tr B2CZS5 B2CZS5_WHEAT ICE87 OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	UniProt
Triticum urartu ICE1	tr M7Z1P4 M7Z1P4_TRIUA Transcription factor ICE1 OS=Triticum urartu GN=TRIUR3_16046 PE=4 SV=1	UniProt
Selaginella moellendorffii ICE	tr D8RIG6 D8RIG6_SELML Putative uncharacterized protein ICE OS=Selaginella moellendorffii GN=ICE PE=4 SV=1	UniProt
Physcomitrella patens A9S695	tr A9S695 A9S695_PHYPA Predicted protein OS=Physcomitrella patens subsp. patens GN=PHYPADRAFT_209063 PE=4 SV=1	UniProt
Medicago truncatula ICE	tr G7IWT3 G7IWTE3_MEDTR Inducer of CBF expression OS=Medicago truncatula GN=MTR_3g030700 PE=4 SV=1	UniProt
Setaria italica Si006877m	tr K3XY69 K3XY69_SETIT Uncharacterized protein OS=Setaria italica GN=Si006877m.g PE=4 SV=1	UniProt
Oryza sativa Os02t0120500	Oryza sativa Os02t0120500	GenBank
Arabidopsis thaliana AT1G01260	Arabidopsis thaliana AT1G01260	GenBank

Таблица 6. Географическое происхождение рас *A. thaliana*, использованных для анализа полиморфизма, и % сходства последовательностей генов *ICE1* and *ICE2* с генами расы Col-0.

Название	Регион	% сходства		Название	Регион	% сходства		Название	Регион	% сходства	
Северные				Умеренные				Южные			
		<i>ICE1</i>	<i>ICE2</i>			<i>ICE1</i>	<i>ICE2</i>			<i>ICE1</i>	<i>ICE2</i>
Oy-0	Норвегия	97	100	Bur-0	Ирландия	100	97	Sus-1	Киргизия	100	99
Ber	Дания	99	99	Col-0	США	100	100	Co-1	Португалия	100	99
Hau-0	Дания	99	100	Di-G	Франция	100	99	Aitba-1	Марокко	100	98
St-0	Швеция	100	99	Edi-0	Шотландия	97	97	Can-0	Испания	100	96
Pog-0	Канада	99	99	Gre-0	США	100	100	Fei-0	Португалия	100	98
Est	Эстония	100	99	Hi-0	Нидерланды	100	96	Ct-1	Италия	100	96
Es-1	Финляндия	100	100	Kn-0	Литва	100	96	Mt-0	Ливия	100	96
Lom-1-1	Норвегия	100	99	Ler-1	Польша	100	96	Sf-0	Испания	97	99
Lu-1	Швеция	100	99	No-0	Германия	97	96	Had-1	Ливан	100	99
Hel-3	Финляндия	100	99	Pi-0	Австрия	99	99	Bik-1	Ливан	99	99
Spr1-2	Швеция	100	99	Po-0	Германия	97	100	Hal-1	Италия	100	100
Spr1-6	Швеция	100	99	Rsch-0	Россия	100	96	Cvi-0	Кабо-Верде	100	97
Ko-2	Дания	100	99	Rub-1	Украина	100	99	Anz-0	Иран	99	99
Van-0	Канада	99	99	Stw-0	Россия	100	99	Dja-1	Киргизия	100	99
Tamm-2	Финляндия	100	99	Tsu-0	Япония	98	96	Shahdara	Таджикистан	100	99
U112-3	Швеция	100	99	Wil-2	Литва	100	96	Kondara	Таджикистан	100	99
U112-5	Швеция	99	99	Ws-0	Белоруссия	100	96	Bla-1	Испания	100	99
Var2-6	Швеция	99	100	Wu-0	Германия	98	96	Bl-1	Италия	99	99
Fab-2	Швеция	100	99	Yo-0	США	100	100	Nemrut-1	Турция	100	98
Bil-5	Швеция	100	100	Zu-0	Швейцария	100	99	Kas-1	Индия	100	100

Поиск нуклеотидных последовательностей *ICE1* и *ICE2* различных рас *A.thaliana* осуществляли в базе данных 1001 геном (<http://1001genomes.org/>). Список рас приведен в табл. 6. Визуализацию и сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили в программе BioEdit v7.2.0 (Hall 1999). Множественные выравнивания проводили с использованием программы ClustalW (Thompson et al. 1994). Для анализа уровня полиморфизма с помощью показателя π (наблюдаемая средняя доля нуклеотидных различий между секвенированными аллелями (Tajima and Nei, 1984), оценки отклонений наблюдаемого полиморфизма нуклеотидов от нейтральности с помощью теста Таджимы (Tajima, 1989), МакДональда-Крейтмана (McDonald and Kreitman 1991) и индекса нейтральности использовали пакет DnaSP 5.2 (Rozas et al. 2003). Тест на гетерогенность распределения полиморфизма к дивергенции (тест МакДональда) проводили с помощью программы DNA Slider (McDonald 1998). Процент идентичности нуклеотидных последовательностей подсчитывали с помощью программы UGENE v1.11.5 (Okonechnikov et al. 2012). Для филогенетического анализа использовали методы максимального правдоподобия (Maximum likelihood, ML) и присоединения соседей (Neighbour joining, NJ) (Saitou and Nei, 1987) в пакете MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011, <http://www.megasoftware.net>). Нуклеотидные построения проводились с применением эволюционных моделей p-distance и Poisson substitution model, соответственно. Оценка достоверности узлов выполнялась с использованием бутстрэп-теста (Felsenstein, 1985).

Использование баз данных для анализа нуклеотидных последовательностей и экспрессии генов

Поиск возможных сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторной последовательности генов *ICE* проводили с помощью AthaMap database (Steffens et al., 2005, <http://www.athamap.de/>) и A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (PLACE) (Higo et al., 1999; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), в регионе 1 т.п.н. и 1,2 т.п.н. выше сайта начала трансляции генов *ICE1* и *ICE2*, соответственно. Данные микроэрепей по экспрессии генов в различных условиях и органах были получены из GENEVESTIGATOR (Zimmermann et al., 2004) и Arabidopsis e-FP Browser (

bin/efpWeb.cgi). Используемые в работе праймеры подбирали с помощью программы Primer3 (v. 4.0.0) (Untergasser et al., 2012; <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>).

Анализ структуры белка

Для поиска консервативных доменов белка использовали базы данных 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/>). Для предсказания вторичных структур белка использовали PSIPRED (McGuffin et al., 2000, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Для предсказания потенциальных PEST доменов белка использовали алгоритм Emboss epestfind (Rogers *et al.* 1986, <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>), доменов NLS - NLStradamus (Nguyen et al. 2009, <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>), сайтов полиаденилирования - Poly(A) Signal Miner (Liu et al. 2005, <http://dnafsmineer.bic.nus.edu.sg/PolyA.html>), сайтов фосфорилирования - KinasePhos 2.0 (Wong et al., 2007, <http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/index.html>).

Анализ геномной микросинтезии

Синтенные участки хромосом были идентифицированы с помощью Plant Genome Duplication Database (PGDD) (Lee et al., 2012, <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>) и подтверждены с помощью программы SynFind (Lyons et al., 2008; <https://genomeevolution.org/CoGe/SynFind.pl>).

Вычисление времени дупликации гена

Примерную дату происхождения дупликации оценивали с помощью числа закрепившихся синонимичных замен к числу потенциально возможных синонимичных замен (K_s) как характеристики темпа молекулярной эволюции по формуле $T = K_s/2\lambda$ (Lynch and Conery, 2000), где λ - это скорость молекулярной эволюции, составляющая для *A.thaliana* 1.5610283×10^{-8} замен на синонимичный сайт в год (Blanc and Wolfe, 2004). Значения K_s для паралогов были получены с помощью DnaSP 5.2 (Rozas et al., 2003).

Регистрация последовательностей ДНК в базе данных GenBank NCBI

Для регистрации нуклеотидных последовательностей генов в GenBank NCBI использовали программу Bankit (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>). Зарегистрированные последовательности KM593299 и KM210288 представлены в Приложении.

Статистическая обработка данных

Обработку результатов ПЦР-РВ и вычисление стандартной ошибки среднего (SEM) проводили с помощью Microsoft Office Excel. Однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA), с последующим разделением данных на гомогенные группы (статистически не отличающиеся друг от друга) по методу Ньюмана-Кьюлса (с уровнем значимости 1%), t-тест Стьюдента (с уровнем значимости 5%), и корреляционный анализ проводили в программе STATISTICA 6.1 (StatSoft. Inc.).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ филогении гена *ICE2*

Гены *ICE1* и *ICE2* *A.thaliana* могли возникнуть в результате дупликации предкового гена. Для установления времени этого события мы определили значение K_s для пары генов *ICE*, которое составило 0,56. На основе этой величины можно рассчитать примерное время дупликации с использованием метода, предложенного (Lynch and Conery, 2000) (см. раздел «Материалы и методы»). Расчет показал, что дупликация произошла приблизительно 17.9 миллионов лет назад.

Для подтверждения происхождения гена *ICE2* в результате дупликации был проведен филогенетический анализ белков-ортологов *ICE1* и *ICE2* из различных растений. Для реконструкции филогении генов *ICE1* и *ICE2* потенциальные ортологи их белковых продуктов были идентифицированы путем поиска гомологичных белковых последовательностей в доступных базах данных транслированных генов. Список белков *ICE*, использованных при анализе, включил 79 последовательностей из 61 вида (табл. 5).

Филогенетические деревья были построены по методу максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и объединения соседей (neighbor joining, NJ). Топология дендрограмм, построенных на основании последовательностей белков Капустных разными методами, была одинакова (рис. 10; Приложение, рис. 1). В геномах нескольких видов Капустных (*Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Thellungiella halophila* и *Capsella rubella*) были обнаружены гены-гомологи *ICE1* и *ICE2*. На филогенетическом древе последовательности белков Капустных формируют два кластера: *ICE1* и *ICE2* (рис. 1). Судя по бутстреп-значениям, эти кластеры выделяются с высокой степенью достоверности. В геномах представителей других семейств цветковых растений, как однодольных, так и двудольных, а также мха *Physcomitrella patens* и плауна *Selaginella moellendorffii*, по-видимому, находятся ортологи только одного гена *ICE* *A.thaliana* (рис. 10). Кроме того, было обнаружено наличие нескольких ортологов генов *ICE* у *Brassica rapa* и *Glycine max*, что говорит о возможной дупликации гена *ICE1* у *Glycine max* и *ICE1* и *ICE2* у *Brassica rapa* после выделения в отдельный вид. У *Brassica rapa*

обнаружено по 2 паралога *ICE1* и *ICE2*. У сои 6 паралогов гена *ICE1 A.thaliana* группируются в две клады: *ICE1*, 3, 4 и *ICE2*, 5, 6. По-видимому, они появились независимо от *ICE1* и *ICE2* Капустных. Что интересно, в эти клады входят также гомологи *ICE* из других видов семейства Бобовые. Вероятно, первоначально дупликация *ICE* произошла у одного из предковых Бобовых, затем последовали дополнительные дупликации (как у сои *Glycine max*), либо потеря одного из паралогов (как у люцерны *Medicago truncatula*, лядвенца *Lotus japonicus*, фасоли *Phaseolus vulgaris*).

Поиск гомологов генов *ICE* в геномах грибов (*Boletus edulis*) и зеленых водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri*) не принес результатов. Таким образом, ген *ICE1* присутствует в геномах всех исследованных однодольных и двудольных растений, в то время как *ICE2* появился в результате недавней дупликации в семействе Капустные. В различных источниках возраст этого семейства оценивается от 24 до 40 миллионов лет (Franzke et al., 2011). Внутри семейства произошли дупликации 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, установленная дупликация генов *ICE* предположительно произошла уже после выделения Капустных в самостоятельную группу, но не в ходе полногеномной дупликации.

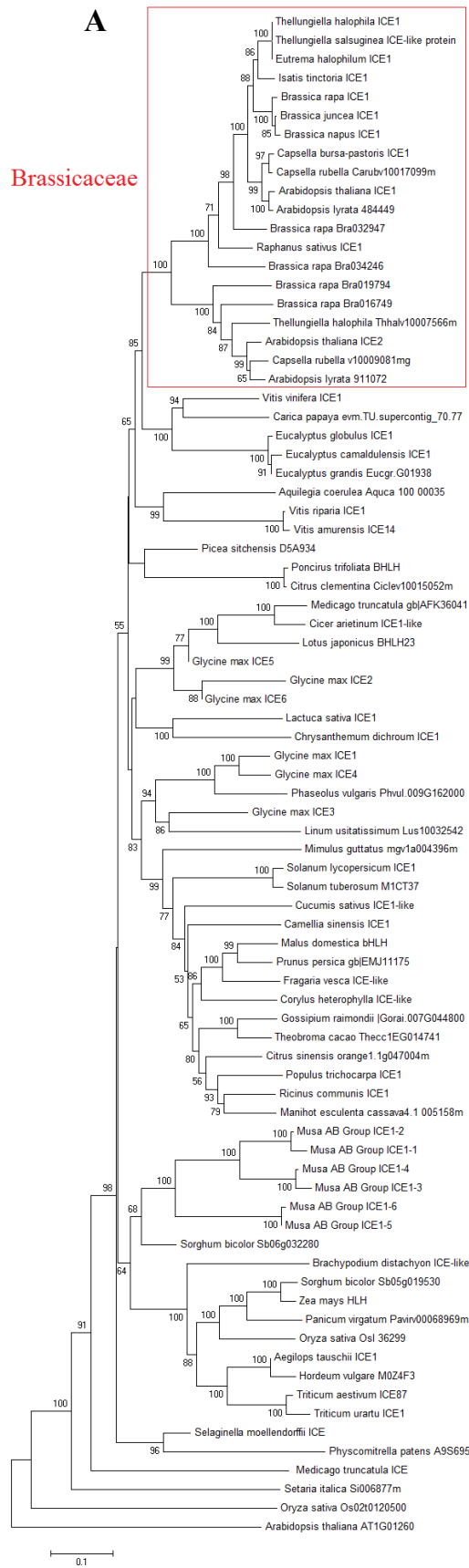
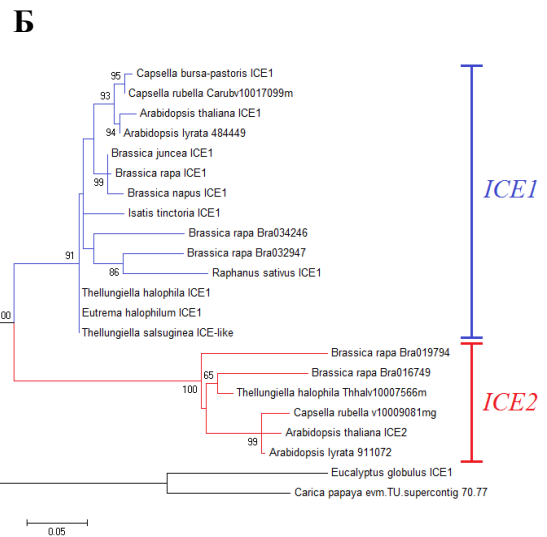


Рис. 10. (А) Дендрограмма 79 ICE-подобных белков растений. Дерево было построено с помощью алгоритма NJ в программе MEGA 5.2 и укоренено относительно аминокислотной последовательности белков семейства bHLH *A.thaliana* (*At1g01260*) и риса (*Os02t0120500*). (Б) Дендрограмма 20 гомологов белков ICE Капустных. Дерево было построено с помощью алгоритма ML в программе MEGA 5.2 и укоренено относительно аминокислотных последовательностей ICE-подобных белков из *Eucalyptus globulus* и *Carica papaya*. Длина ветвей отражает число аминокислотных замен на сайт, масштаб обозначен в нижней части рисунка. Бутстреп рассчитан для 1000 повторов; только значения бутстреп>50 нанесены на схему.



3.2. Анализ геномной микросинтении участков хромосом 1 и 3 *A.thaliana*

Дубликации генов часто являются результатом дубликации сегментов хромосом. Для получения дополнительного подтверждения возможного происхождения гена *ICE2* в результате дубликации был произведен анализ микросинтении, то есть коллинеарного расположения генов на определенных участках хромосом. Сравнение структуры хромосом 1 и 3 *A.thaliana* был проведен с использованием ресурса Plant Genome Duplication Database, PGDD (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>). Выяснилось, что гены *ICE1* и *ICE2*, расположенные на 3 и 1 хромосомах, соответственно, относятся к одному синтенному блоку, содержащему 18 пар гомологичных генов (рис. 11). Эти данные были подтверждены с помощью программы SynFind (<https://genomevolution.org/CoGe/SynFind.pl>). Список 18 пар гомологичных генов представлен в Приложении (табл. 3). Порядок расположения генов сохраняется на обеих хромосомах, они ориентированы в одну сторону, за исключением некоторых генов. Эти данные позволяют предположить, что произошла дубликация данного фрагмента с последующей инверсией, что, вероятно, привело к возникновению ряда новых паралогичных генов, включая *ICE2*

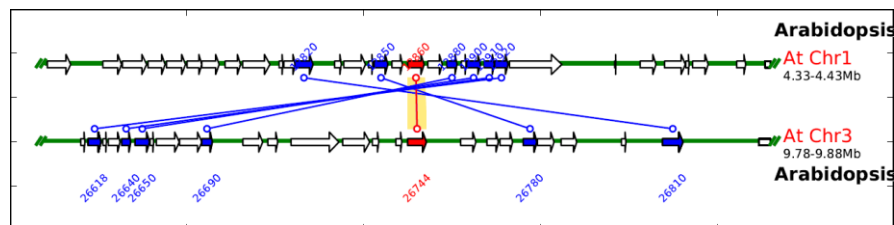


Рис. 11. Схема коллинеарного расположения генов на участках хромосом 1 и 3 *A.thaliana*. Красные стрелки – гены *ICE1* и *ICE2*, синим выделены некоторые коллинеарно расположенные гены (источник – PGDD). Хромосома 1 представлена смысловой нитью ДНК, хромосома 3 – антисмысловой.

3.3. 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. С целью найти специфичный для белка *ICE2* домен (или домены) было осуществлено выравнивание 14 аминокислотных последовательностей белка *ICE1*

и 6 последовательностей ICE2 ряда видов растений семейства Капустные с помощью алгоритма ClustalW. На рис. 12 представлено выравнивание и соответствующие участкам белка области гена. Выяснилось, что участок из 190 аминокислотных остатков на С-конце белка, включающий домен bHLH, является высококонсервативным. Эта область соответствует части первого и 2-4 экзонам гена (рис. 12).

Известно, что гены *ICE1* и *ICE2* обладают идентичной нуклеотидной последовательностью, кодирующей домен bHLH (Fursova et al., 2009). Большая часть первого экзона является вариабельной. Мы обнаружили последовательность из 19 аминокислот, специфичную только для белков ICE2, и 24-аминокислотную, характерную для ICE1 (рис. 12). Как ICE1-, так и ICE2-специфичные домены состоят преимущественно из гидрофобных аминокислотных остатков, однако ICE2-специфичный домен является отрицательно заряженным, в отличие от нейтрального ICE1-специфичного. Поиск консервативных доменов, обладающих подобной обнаруженным нами структурам, в нескольких базах данных не принес результатов. Мы предполагаем, что обнаруженный отрицательно заряженный домен может быть важен для специфичных функций белка ICE2.

Ряд консервативных доменов был обнаружен при анализе литературы, в электронных базах данных и при анализе последовательностей специальными программами. Белки ICE имеют ряд общих консервативных доменов: bHLH, необходимый для активации экспрессии генов-мишеней, состоящий из двух частей сигнал ядерной локализации (NLS), ZIP домен, кислотный домен, серин-богатую область, АСТ-подобный домен, KRAAM мотив. АСТ-подобный домен (Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA-like) длиной около 90 аминокислот был обнаружен у ряда белков семейства bHLH. Он участвует в димеризации и других белок-белковых взаимодействиях (Feller et al., 2006). Кроме того, для ICE1 доказано наличие сайта фосфорилирования, сумоилирования и убиквитинирования, важных для посттрансляционных модификаций белка, включающих холодовую активацию и деградацию при нормальных условиях (Chinnusamy et al., 2003; Miura et al., 2007; Kanaoka et al., 2008; Miura et al., 2011). Для ICE2 можно лишь предполагать, что данные сайты выполняют такие же функции. Эти и другие особенности структуры представлены на рис. 12.

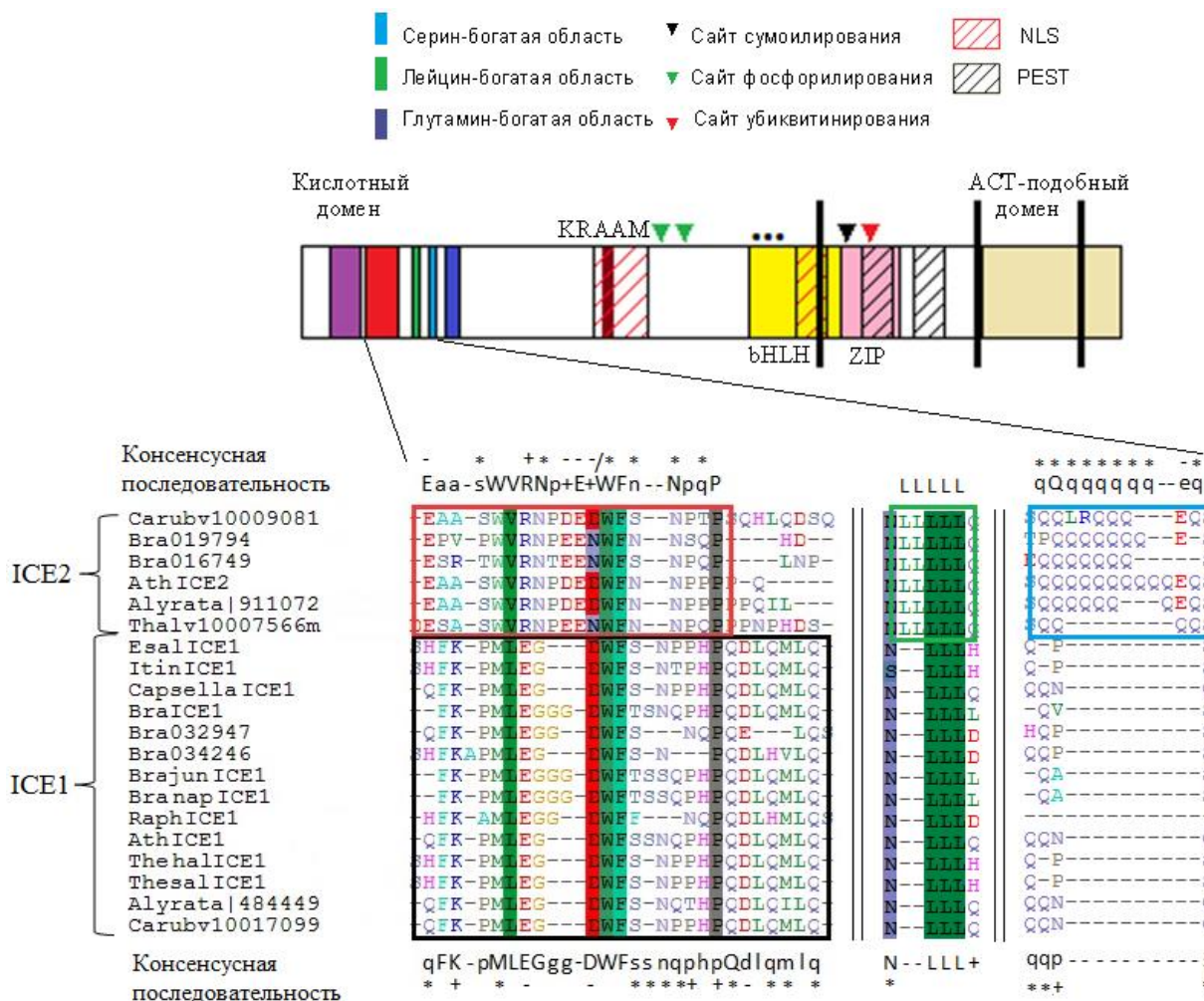


Рис. 12. Анализ структуры белков ICE1 и ICE2 у Капустных. Схема белка представлена над множественным выравниванием аминокислотных последовательностей. Границы экзонов отмечены вертикальными линиями. Специфичные для белка ICE2 домены отмечены *. Точками отмечены ключевые для связывания ДНК а.о. Специфичный для ICE1 и ICE2 домены обведены на выравнивании в красную и черную рамки, соответственно. По две 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.

ICE1 имеет 1 вероятный PEST домен (сигнальную последовательность, важную для деградации белка), ICE2 – два. При сравнении последовательностей мы обнаружили, что специфичными для ICE2 являются глутамин-богатый и лейцин-богатый домены (рис. 12). Они находятся в варибельной части первого экзона и могут формировать дополнительные α -спирали, согласно моделированию

в программе PSIPRED (рис. 13). Других различий во вторичной структуре гомологов обнаружено не было (рис. 13). Несмотря на меньшую длину белка, для ICE2 было предсказано большее число потенциальных сайтов фосфорилирования (табл. 7). Это может означать, что белок ICE2 находится под строгим посттрансляционным контролем. В целом, структура гомологов консервативна, однако ICE2 приобрел новые домены со времени дивергенции этих генов, предположительно влияющих на вторичную структуру белка и его заряд.

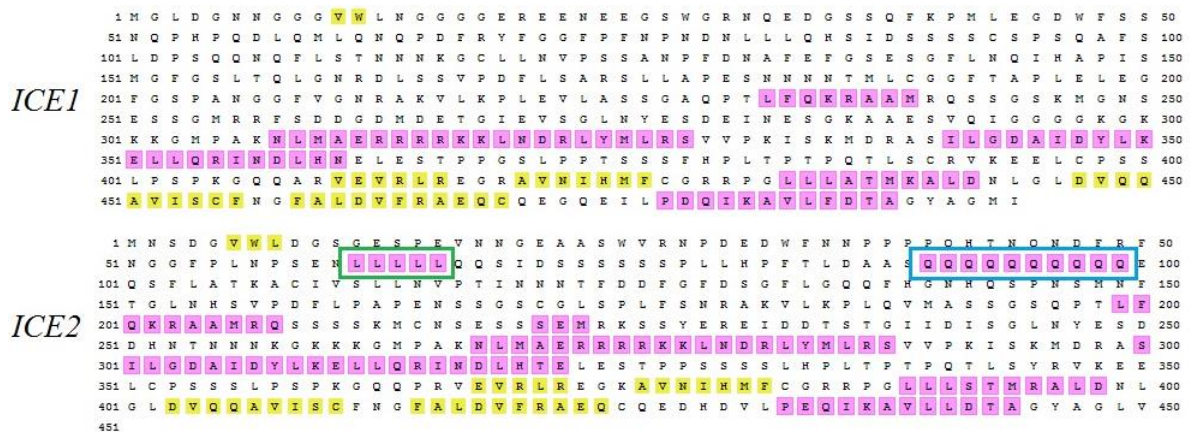


Рис. 13. Схемы предсказанных вторичных структур белков ICE1 и ICE2. Лейцин-богатый и глутамин-богатые домены, формирующие α -спирали, выделены зеленым и синим прямоугольником, соответственно. Розовым цветом выделены α -спирали, желтым – β -слои. Изображение получено с помощью PSIPRED (McGuffin et al., 2001; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Таблица 7. Число предсказанных сайтов фосфорилирования в белках ICE1 и ICE2.

Белок	Сайт фосфорилирования		
	Серин	Треонин	Тирозин
ICE1	53	13	5
ICE2	54	17	6

Сайты предсказаны с помощью KinasePhos 2.0 (Wong et al., 2007) с использованием параметров по умолчанию.

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

Известно, что мутации в промоторной области гена могут привести к субфункционализации гена (Lynch and Force, 2000). Для анализа изменений, произошедших в регуляторной области *ICE2* после дупликации и дивергенции, был произведен поиск в компьютерных базах данных цис-элементов. Было

проанализировано межгенное пространство в 5'-области (1 – 1,2 т.п.н.) до сайта начала транскрипции *ICE1* и *ICE2* (предполагаемая промоторная область гена). В табл. 8 представлены обнаруженные цис-элементы из генома *A.thaliana*, их нуклеотидные последовательности, специфические транс-действующие факторы и предполагаемые функции гена, опосредованные наличием цис-элемента. В Приложении (табл. 5) суммированы данные об обнаруженных цис-элементах, впервые выявленных в геномах других видов растений.

В промоторе гена *ICE2* было обнаружено 2 элемента, участвующих в регуляции образования боковых почек, *SREATMSD* и *UP2ATMSD*, в промоторе *ICE1* также присутствует *UP2ATMSD*, но не *SREATMSD*. Два регуляторных элемента *ICE2*, *TL1ATSAR* и *ATCTA*, участвуют в ответе на биотический стресс (табл. 8), три – в ответе на гиббереллин (Приложение, табл. 5), шесть связаны с регуляцией световыми сигналами и фотосинтезом. Несколько элементов, связанных с абиотическим стрессом и ответом на свет, были обнаружены и в регуляторной области *ICE1*. Также был обнаружен мотив *CM2*, известный как сайт связывания транскрипционного фактора *SAMTA3*, который активирует гены холодового ответа *CBF1* и *CBF2* (Doherty et al., 2009). Возможно, ген *ICE1* регулируется не только на посттрансляционном, но и транскрипционном уровне. В промоторе *ICE2* наблюдается повышенное число цис-элементов, отвечающих за рост боковых побегов и корней, а также участвующих в биотическом стрессовом ответе и ответе на свет. Это может говорить о том, что ген эволюционирует в сторону приобретения новых функций.

Для сравнения данных о возможных механизмах регуляции генов *ICE*, полученных при анализе промоторных последовательностей, с данными об экспрессии гомологов под влиянием тех или иных условий, в различных тканях и на различных стадиях развития, были рассмотрены данные микроэррей анализа из базы данных *GENEVESTIGATOR* (Zimmermann et al., 2004). Экспрессия *ICE1* наиболее высока в замыкающих клетках устьиц, эндосперме и эмбриональной ткани, *ICE2* – в замыкающих клетках устьиц, апексе побега, листовых примордиях и боковых почках (Приложение, рис. 1). Высокий уровень экспрессии гомологов в клетках устьиц объясняется их ролью в формировании устьиц (1). Обнаруженные в промоторной области цис-элементы *UP2ATMSD* и *SREATMSD* могут играть роль

в повышенной экспрессии *ICE2* в апексе побега и боковых почках. Экспрессия *ICE1* в эндосперме может быть опосредована мотивом AACACOREOSGLUB1, известным как регулятор эндосперм-специфичной экспрессии в рисе; мотив RYREPEATBNNAPA из *Brassica napus* может отвечать за экспрессию *ICE1* в семенах (Приложение, табл. 5).

Таблица 8. Вероятные цис-элементы в промоторной области генов *ICE1* и *ICE2*. Представлены высоконсервативные элементы из генома *A.thaliana*, состоящие не менее чем из 6 нуклеотидов.

Ген(ы)	Название сайта	Консенсусная последовательность	ТФ	Семейств	Функция
<i>ICE2</i>	ATCTA	CAATCTAAATATCTA AAATATAAA	RAP2.2	ERF/AP 2	Устойчивость к <i>Botrytis cinerea</i> , ответ на этилен, гипоксию, каротеногенез
<i>ICE2</i>	PREATPRODH	ACTCAT	ATB2	bZIP	Ответ на гипоосмолярность
<i>ICE2</i>	RBCSCONSEN SUS	AATCCAA	-	-	Консенсусная последовательность Рубиско
<i>ICE2</i>	SBOXATRBCS	CACCTCCA	ABI4	ERF/AP 2	"S-box" консервативный элемент промоторов Рубиско, сайт связывания ТФ ABI4
<i>ICE2</i>	SREATMSD	TTATCC	-	-	Ответ на воздействие сахаров, рост боковых почек
<i>ICE2</i>	TBOXATGAPB	ACTTTG	-	-	Активация экспрессии в ответ на свет
<i>ICE2</i>	TELOBOXATE EF1AA1	AAACCCTAA	-	-	Активация экспрессии в корневых зачатках
<i>ICE2</i>	TL1ATSAR	CTGAAGAAGAA	TBF1	HSF	Растительный иммунитет (Systemic acquired resistance)
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	UP2ATMSD	AAACCCTA	-	-	Рост боковых почек
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	ANAERO1CON SENSUS	AAACAAA	-	-	Ответ на анаэробноз
(<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>)	ANAERO3CON SENSUS	TCATCAC	-	-	Ответ на анаэробноз
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	ARFAT	TGTCTC	ARF1	ARF	Ранний ответ на ауксин
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	CCA1ATLHCB 1	AAMAATCT	CCA1	Myb-like	Регулируется фитохромом
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	POLASIG1	AATAAA	-	-	Часть сигнала полиаденилирования (near upstream element)
<i>ICE1</i>	CM2	GAAACTCCGCGTTC GACCCACAAATA, ATTTGGCTAAACGC GTGTGTGCGTGTGT GT	CAMTA 3	CAMTA	Ответ на холодовой стресс, абиотический стресс, Cold stress response, этилен-опосредованное увядание
<i>ICE1</i>	MYB2AT	ТААСТГ	АТМЫВ	МЫВ	Ответ на водный стресс

Затем были проанализированы изменения в экспрессии генов *ICE* в ответ на стрессы различной природы с помощью данных GENEVESTIGATOR. Выяснилось, что интенсивный свет индуцирует экспрессию *ICE2* (Приложение, рис. 1). Относительный уровень экспрессии гена повышается в четыре раза у образцов, выращенных на свету, либо при перемещении растения из темноты на свет; экспрессия *ICE1* изменялась незначительно в подобных экспериментах. Подобный ответ гена *ICE2* на свет может быть объяснен наличием в промоторе четырех элементов, известных как отвечающих на свет (*RBCSCONSENSUS*, *SBOX-ATRBCS*, *TBOXATGAPB*, *CCA1ATLHCB1*). Наличие мотива *CCA1ATLHCB1* связывает экспрессию *ICE2* с циркадными ритмами. Данный мотив присутствует в промоторах генов *CBF1-3*; связывание белка *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* (*CCA1*) с этим элементом вызывает повышение экспрессии этих генов в утренние часы (Dong et al., 2011).

Данные GENEVESTIGATOR по гену *ICE1* показывают, что его экспрессия не зависит от светового режима, в отличие от *ICE2* (Приложение, рис. 1). Таким образом, регуляция *ICE2* циркадными часами возможна, однако не доказана. Экспрессия гена *ICE1* также повышается под действием АБК и брассинолида (Приложение, рис. 1). Цис-элементы, связанные с ответом на холод (*CM2*) и водный стресс (*MYB2AT*), возможно связаны с наблюдаемым изменением экспрессии. Таким образом, биоинформатический и экспрессионный анализ предсказывают наличие транскрипционной регуляции для *ICE1* помимо уже известной посттрансляционной (см. Обзор литературы). Транскрипционная регуляция также возможна и для *ICE2*, однако эти данные требуют дальнейших исследований для подтверждения.

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

Различия между расами *A.thaliana* по устойчивости к холоду являются следствием адаптаций, возникающих под влиянием различного давления отбора в различных условиях. Для установления генетических основ таких адаптаций необходимо выявить связь между внутривидовым полиморфизмом по отдельным генам и фенотипической вариабельностью по устойчивости к холоду. Более того,

поскольку гены, контролирующие адаптивные вариации, являются мишенями действия естественного отбора, анализ полиморфизма ДНК этих генов позволяет установить силу и тип отбора, действующие на ген. Сегодня появились широкие возможности для такого рода исследований, поскольку в результате выполнения проекта «1001 геном *A.thaliana*» созданы базы данных, где представлены нуклеотидные последовательности геномов природных рас, имеющих разное географическое происхождение. Задачей данного раздела работы было изучение возможной связи внутривидового полиморфизма генов *ICE1* и *ICE2* с экологически значимой фенотипической вариабельностью по устойчивости к холоду, обусловленной географическим происхождением.

3.5.1. Нуклеотидный полиморфизм по генам *ICE1* и *ICE2* в контексте географического происхождения рас

Для изучения нуклеотидного полиморфизма по генам *ICE1* и *ICE2* в зависимости от географического происхождения было выбрано 60 рас *A.thaliana* из различных регионов Земного шара. Они были поделены на три группы согласно широте их географического ареала: Северная группа объединила расы из районов от 50 градусов северной широты ($^{\circ}\text{N}$) и выше; Умеренная – от 43 $^{\circ}\text{N}$ до 50 $^{\circ}\text{N}$ и Южная – от 43 $^{\circ}\text{N}$ и ниже. Расы, использованные для анализа, а также регионы их происхождения приведены в Таблице 2 (в главе «Материалы и методы»). Нуклеотидные последовательности генов *ICE* были взяты из базы данных 1001 геном (<http://1001genomes.org/>), или получены путем секвенирования ДНК растений. Было проанализировано в общей сложности 2258 п.н. гена *ICE2*, включая 405 нуклеотидов 5'-НТР, 4 экзона, 3 интрона и 218 нуклеотидов 3'-НТР. Проанализированная последовательность гена *ICE1* составила 2419 п.н.: 249 п.н. 5'-НТР, 4 экзона, 3 интрона и 263 п.н. 3'-НТР. В табл. 9, 10 и 11 представлены данные о нуклеотидном разнообразии генов-паралогов.

Установлено, что ген *ICE2* характеризуется большим числом гаплотипов, т.е. наборов сцепленных однонуклеотидных замен (табл. 9): 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. 9). Среди полиморфных сайтов обоих генов большинство составляют минимально-

информативные сайты (parsimony-informative polymorphic sites) (то есть имеющие минимум два нуклеотидных варианта, встречающихся как минимум дважды) и лишь примерно треть представляют единичные нуклеотидные замены (синглетоны, табл. 9).

Таблица 9. Оценка нуклеотидного полиморфизма генов *ICE1* и *ICE2* *A. thaliana*. *S* – число вариабельных сайтов, *h* – число гаплотипов, *S*(*i*) – число сайтов InDel, *h*(*i*) – число InDel гаплотипов, π (*i*) – InDel разнообразие.

Ген	Группа	<i>S</i>		<i>h</i>	<i>S</i> (<i>i</i>)	<i>h</i> (<i>i</i>)	π (<i>i</i>)	Число рас со стоп-кодоном в последовательности
		Синглетоны	Минимально-информативные сайты					
<i>ICE1</i>	Северная	16	32	13	8	3	0.00042	0
	Умеренная	8	44	11	8	6	0.00105	0
	Южная	23	26	11	6	4	0.00044	0
	Все	18	45	24	7	9	0.00063	0
<i>ICE2</i>	Северная	6	37	17	3	4	0.00036	0
	Умеренная	13	55	15	8	9	0.00130	0
	Южная	13	56	20	7	8	0.00073	4
	Все	20	64	46	8	10	0.00064	4

На основе нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья для генов *ICE1* и *ICE2*. Некоторые последовательности на обоих деревьях образовали крупные кластеры с бутстреп поддержкой 99%, также наблюдалось несколько более мелких групп (рис. 14). Однако эти группы включали в себя аллели гена, характерные для рас из разных географических зон, т.е. были в большой степени случайными и не связанными с регионами происхождения рас. Это становится хорошо заметно при маркировании каждой группы рас соответствующим цветом (рис. 14). Из этого можно сделать вывод, что внутривидовая генетическая вариабельность *A. thaliana* была сформирована при распространении вида по планете под давлением отбора, а не зависит от современного ареала рас, формирующимися и изменяющимися под влиянием миграции и географической изоляции. К подобному выводу пришли и исследователи, изучавшие вариабельность *A. thaliana* по времени цветения в зависимости от региона происхождения (Le Corre et al., 2002).

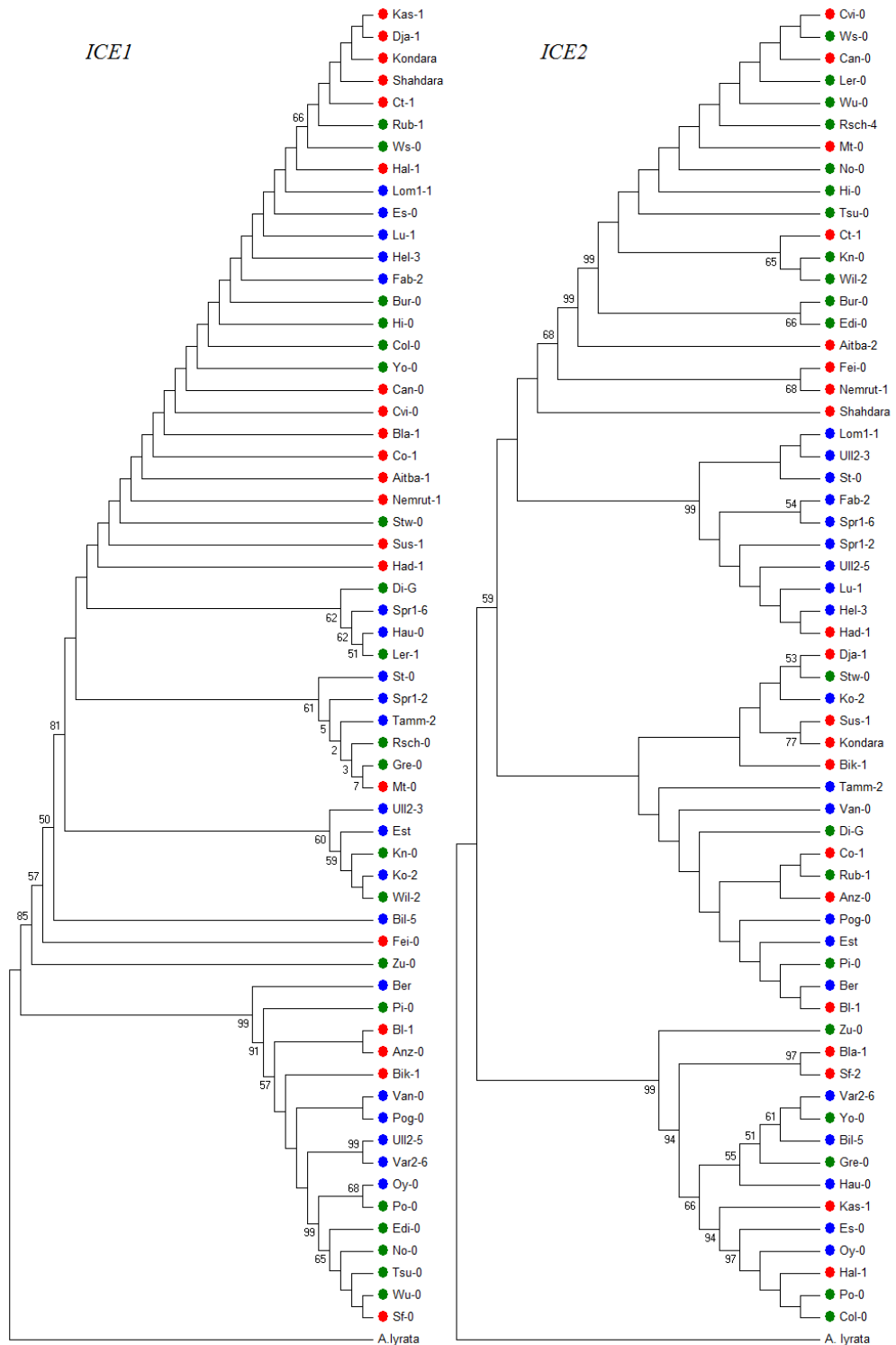


Рис. 14. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей генов *ICE1* (слева) и *ICE2* (справа) 60 рас *A. thaliana*. Дерево было построено с помощью алгоритма NJ в программе MEGA 5.2 и укорнено относительно нуклеотидной последовательности генов *ICE1* и *ICE2* *A. lyrata*. Длина ветвей отражает число нуклеотидных замен на сайт, масштаб обозначен в нижней части рисунка. Бутстреп рассчитан для 1000 повторов; только значения бутстреп > 50 нанесены на схему. Цвет маркера обозначает принадлежность расы к одной из трех групп: синий – Северная, зеленый – Умеренная, красный – Южная.

Показатель нуклеотидного полиморфизма по гену *ICE2* π для всех 60 рас составил 0.0109 (табл. 10), что является достаточно высоким показателем по сравнению с полиморфизмом по некоторыми ранее изученным генам *A.thaliana* (0.00214 - 0.0104, Le Corre et al., 2002; Kupriyanova et al., 2007) и средним уровнем полиморфизма генома *A.thaliana*, 0.006-0.007 (Nordborg et al., 2005). Как и в случае с большинством ранее изученных генов, кодирующая часть гена *ICE2* обладает уровнем полиморфизма более низким, чем некодирующая область ($\pi=0.007$ и 0.0167, соответственно). 3'-фланкирующая область имеет высокий уровень полиморфизма ($\pi=0.2749$), в противоположность низкому нуклеотидному разнообразию 5'-НТР ($\pi=0.00104$). Полиморфизм по гену *ICE1* оказался в целом ниже ($\pi=0.00678$). Кодирующая, некодирующая и 3'-области *ICE1* характеризуются практически одинаковым уровнем нуклеотидного разнообразия, а 5'-НТР также имеет самый низкий показатель π (табл. 10).

Таблица 10. Внутривидовой полиморфизм по гену *ICE1* *A. thaliana* и его отклонение от нейтральности. S – число вариабельных сайтов, π – нуклеотидное разнообразие, н.д. – нет данных.

	Кодирующая область	Синонимичные сайты	Несинонимичные сайты	Некодирующая область	5'-НТР	3'-НТР	«Молчание» сайты	Весь ген
(А) Все расы (n=60)								
Число сайтов	1492	321,69	1145,31	938	294	263	1231,69	2419
S	37	4	32	26	3	10	31	63
π	0.00646	0.00334	0.00708	0.00524	0.00034	0.00550	0.00474	0.00678
Tajima's D	0.6843	0.55030	0.59187	-0.5655	-1.6758	-0.9030	-0.39327	0.15548
(В) Северная группа (n=20)								
Число сайтов	1485	331,53	1147,48	934	297	267	1242,52	2419
S	31	5	25	17	1	5	22	48
π	0.00675	0.00494	0.00691	0.00397	0.00034	0.00334	0.00423	0.00570
Tajima's D	0.5720	0.49391	0.48599	-0.9139	-1.1644	-1.1516	-0.58278	0.03024
(С) Умеренная группа (n=20)								
Число сайтов	1482	332,73	1149,28	910	295	263	1242,72	2419
S	31	5	26	21	0	10	27	53
π	0.00781	0.00557	0.00846	0.00767	0	0.00973	0.00711	0.00776
Tajima's D	1.27468	0.96241	1.26715	0.4838	n.d.	-0.3236	0.62717	0.97705
(D) Южная группа (n=20)								
Число сайтов	1485	333,85	1151,15	934	295	263	1244,85	2419
S	30	4	26	19	2	5	23	49
π	0.00498	0.00329	0.00637	0.00389	0.00068	0.00302	0.00373	0.00457
Tajima's D	-0.4895	-0.07055	-0.54480	-1.2768	-1.5128	-1.3344	-1.08880	-0.83385

На следующем этапе исследования полиморфизм по синонимичным, несинонимичным, молчащим и другим группам нуклеотидных замен был оценен для трех групп рас по отдельности (табл. 10 и 11). Оказалось, что расы из Южной и Умеренной группы имеют показатели нуклеотидного разнообразия по гену *ICE2*, отличные от Северной группы. Значения π составили 0.01075 для Умеренной группы, 0.01139 для Южной и 0.00653 для Северной. Нуклеотидное разнообразие по несинонимичным заменам в Южной группе в 4.5 раза выше, чем в Северной и в 1.6 раза – чем в Умеренной.

Таблица 11. Внутривидовой полиморфизм по гену *ICE2 A. thaliana* и его отклонение от нейтральности. S – число вариабельных сайтов, π – нуклеотидное разнообразие, н.д. – нет данных.

	Кодиру ющая область	Синони мичные сайты	Несинони мичные сайты	Некодиру ющая область	5'-НТР	3'-НТР	«Молчащ ие» сайты	Весь ген
(A) Все расы (n=60)								
Число сайтов	1319	300.32	1001,68	895	399	216	1186,97	2258
S	38	24	14	49	7	17	23	88
π	0.007	0.02328	0.00248	0.01673	0.00104	0.2749	0.01829	0.0109
Tajima's D	0.52448	1,21937	-0.50771	1.2261	-1.8488	1.6463	1.27398	0.90567
(B) Северная группа (n=20)								
Число сайтов	1344	297,58	1043,42	906	405	221	1203,52	2258
S	22	18	5	21	2	7	39	44
π	0.00595	0.02234	0.00129	0.00740	0.00108	0.00741	0.01109	0.00653
Tajima's D	0.89668	1,24109	0.25395	0.5034	-0.5278	-0.5603	0.88841	0.73977
(C) Умеренная группа (n=20)								
Число сайтов	1327	294,39	1025,61	896	399	216	1190.39	2258
S	25	13	12	43	2	16	56	68
π	0.0062	0.01550	0.00357	0.01907	0.00073	0.0317	0.01819	0.01139
Tajima's D	0.64498	0.88980	0.29234	1.6390	-1.1407	1.9264	1.50253	1.30389
(D) Южная группа (n=20)								
Число сайтов	1321	282,16	1028,84	903	402	221	1185,16	2258
S	31	13	18	42	3	17	55	73
π	0.00727	0.01265	0.00587	0.01584	0.00075	0.02815	0.01508	0.01075
Tajima's D	0.38986	0.00407	0.78447	0.8321	-1.7233	0.8508	0.64376	0.66054

Нуклеотидное разнообразие по синонимичным заменам также выше в Южной группе, но в меньшее число раз (в 0.6 относительно Северной и в 0.8 относительно Умеренной). Среди рас Северной группы также наблюдается

наименьший InDel полиморфизм (табл. 9). В Южной группе присутствуют четыре расы, последовательности гена *ICE2* которых содержат стоп-кодон, в других группах подобная мутация не была обнаружена (табл. 9).

Полученные данные говорят о том, что Южные популяции испытывают пониженное давление отбора, а наиболее сильно давление на расы северных регионов. В противоположность этим данным, уровень нуклеотидного полиморфизма по гену *ICE1* практически одинаков для всех трех групп, Южная группа отличается даже несколько пониженным уровнем разнообразия (табл. 10). Однако уровни разнообразия по гену *ICE1* в 2 раза ниже, чем по *ICE2*, что указывает на более сильное давление отбора на *ICE1*.

3.5.2. 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* был произведен по методу скользящего окна (англ. sliding window) (рис. 15). В гене *ICE2* пики «молчащего» полиморфизма присутствуют в 3'-НТР, первом интроне и С-конце белка, соответствующего АСТ-подобному домену. Наиболее отчетливый пик наблюдается во втором интроне. Известно, что естественный отбор приводит к накоплению «молчащих» замен в районе локуса, на который действует отбор (Tian et al., 2002). В связи с этим интересным представляется факт обнаружения альтернативных сайтов полиаденилирования во втором интроне гена *ICE2* и в первом интроне *ICE1* у винограда (Rahman et al., 2014). Однако поиск возможных альтернативных poly(A) сайтов у *A.thaliana* с помощью программы Poly(A) Signal Miner (Liu et al., 2005) не позволил обнаружить такие сайты в интронах изучаемых генов, следовательно, наблюдаемый пик пока не может быть связан с каким-либо функциональным изменением. В гене *ICE1* пики «молчащего» полиморфизма наблюдались в 3'-НТР, сайте сумоилирования, доменах bHLH и NLS (рис. 3).

Распределение несинонимичных замен по гену *ICE2* оказалось неравномерным. Наибольшее число несинонимичных замен в гене *ICE2* наблюдается в вариабельной 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. 15). 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 по последовательности (рис. 15). В целом, наиболее крупный первый экзон в *ICE2* характеризуется более высокой вариабильностью, чем гомологичный ему экзон *ICE1*. Домен bHLH имеет низкий уровень несинонимичного полиморфизма, однако высокий уровень «молчащего» полиморфизма в обоих гомологах, то есть отбор препятствовал аминокислотным заменам в этой части белка. Это также говорит о древнем происхождении и высокой значимости домена.

Для определения характера микроэволюции определенных участков гена было исследовано соотношение несинонимичных и синонимичных замен π_a/π_s , где π_a – число несинонимичных замен на несинонимичный сайт, π_s – число синонимичных замен на синонимичный сайт. Соотношение $\pi_a/\pi_s > 1$ указывает на действие движущего (положительного) отбора, а соотношение $\pi_a/\pi_s < 1$ свидетельствует о том, что ген находится под действием стабилизирующего, или очистительного (отрицательного) отбора (Hurst, 2002). Для полных последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* соотношение π_a/π_s составило 2.1 и 0.79, соответственно. Анализ распределения этого соотношения по гену показал, что высокое значение π_a/π_s для *ICE1* объясняется высоким значением только в одной области, домене ZIP и перекрывающимся с ним предсказанной последовательности PEST (рис. 15). Подобные результаты были получены при анализе всех трех групп популяций (Приложение, рис. 2) Анализ распределения π_a/π_s по гену *ICE2* был также проведен для трех групп рас отдельно. Это соотношение было значительно меньше 1 во всех группах, только в Южной группе наблюдался пик в домене NLS (Приложение, рис. 2). Возможно, в условиях теплого климата адаптация к холоду не является необходимостью, что не препятствовало накоплению мутаций в этом домене, необходимом для правильной локализации белка ТФ.

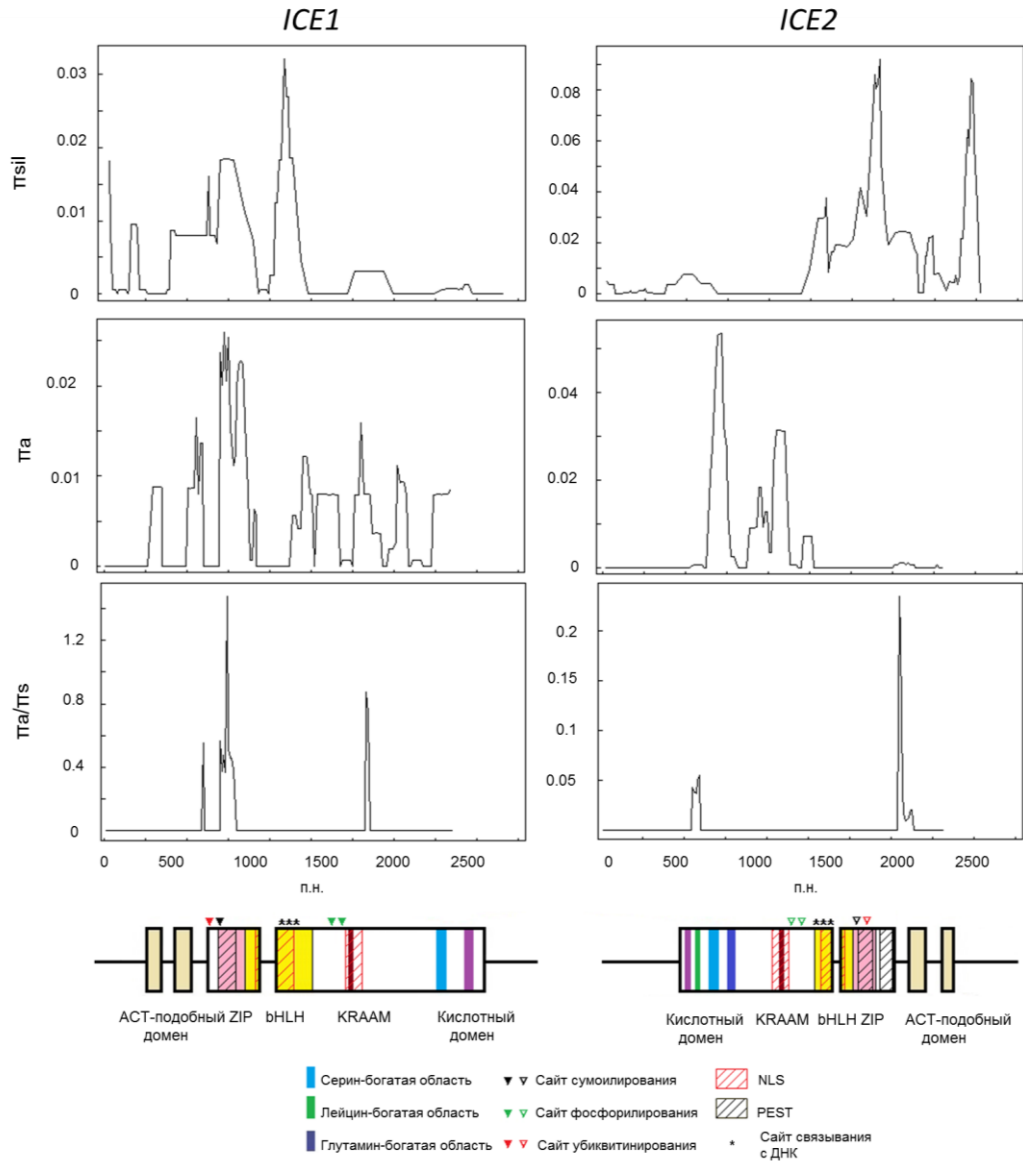


Рис. 15. Распределение «молчащего» (π_{sil}), несинонимичного (π_a) нуклеотидного полиморфизма и соотношения π_a / π_s по генам *ICE1* и *ICE2*. Анализ проведен по методу скользящего окна, длина окна 50 п.н., шаг 10 п.н. Позиции экзонов (прямоугольники), интронов (прямые) и консервативных доменов обозначены внизу рисунка.

3.5.3. 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. 12). При анализе межвидового полиморфизма генов соотношение числа K_a/K_s (ω) несинонимичных и синонимичных замен указывает на направление эволюции гена: значения $\omega > 1$, $=1$ и <1 означают, что на ген действует движущий,

нейтральный и стабилизирующий отбор, соответственно. Значение ω для ортологов *ICE2* (0,506) на порядок выше, чем для ортологов *ICE1* (0,053), следовательно аминокислотная последовательность *ICE2* претерпевает меньшее давление отбора, хотя на оба гена действует стабилизирующий отбор. Это хорошо согласуется с тем, что ген *ICE2* является более молодым в эволюционном плане и способен к быстрому накоплению замен и дивергенции (Hughes, 2002).

Таблица 12. Сравнение последовательностей ортологов и паралогов генов *ICE*

	K_s	K_a	K_a/K_s
Ортологи			
<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
Паралоги			
<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 (табл. 12). Среднее значение ω по всему гену меньше 1, что говорит о стабилизирующем отборе, направленном на устранение изменений с целью сохранения структуры и функций белка. Однако среднее значение ω не отображает возможных изменений, затронувших только определенные домены. Поэтому был проведен дополнительный анализ распределения значений ω по последовательности гена методом движущегося окна между паралогами *ICE1* и *ICE2* *A.thaliana* с целью обнаружения следов движущего отбора (рис. 16). Значение $\omega > 1$ обнаружено в АСТ-подобном домене и домене NLS, а наиболее значительный пик наблюдался в лейцин-богатом домене, специфичном для белков *ICE2*, а также в *ICE2*-специфичной области из 19 отрицательно заряженных аминокислот (рис. 5). Следовательно, движущий отбор действовал на домены белка, важные для димеризации и локализации белка, а также предположительно для осуществления им специфичных функций. Таким образом, движущий отбор привел к структурной дивергенции генов *ICE*, что возможно явилось основой функциональной дивергенции белков ICE.

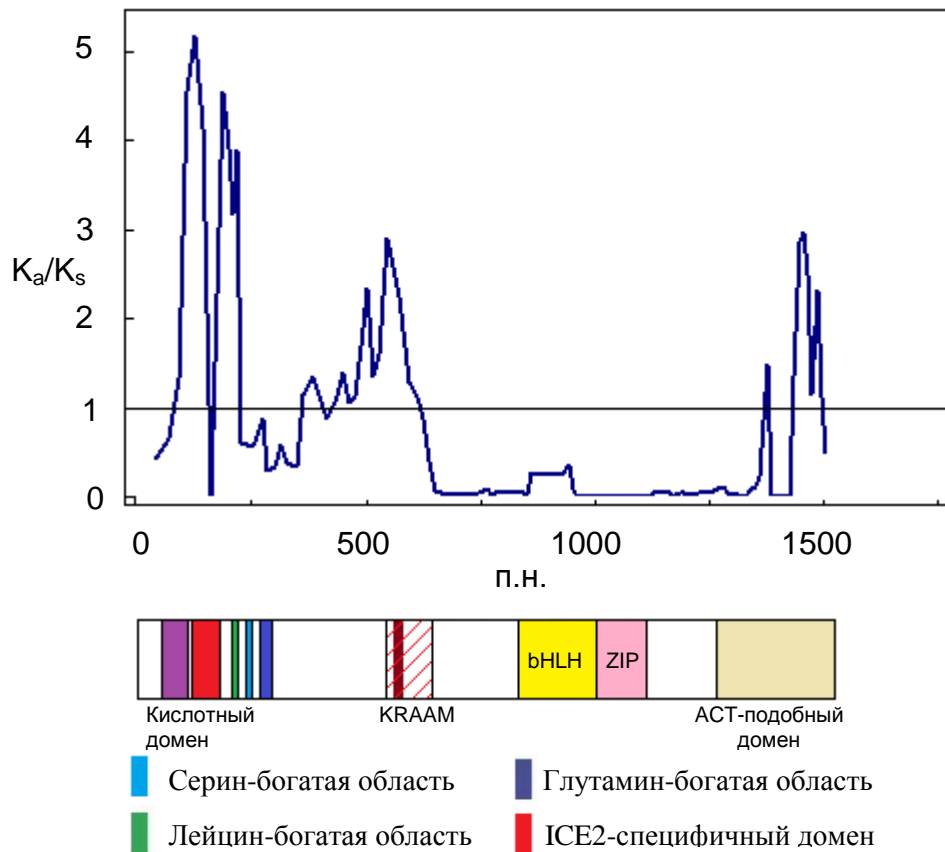


Рис. 16. Распределение значений ω по кодирующей области паралогов *A. thaliana* *ICE1* и *ICE2*. Анализ проведен по методу скользящего окна, длина окна 50 п.н., шаг 10 п.н. Позиции белковых доменов обозначены внизу рисунка.

3.5.4. 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, используют ряд тестов. McDonald and Kreitman (1991) предположили, что повышенное значение K_a/K_s по сравнению с π_a/π_s указывает на положительный Дарвиновский отбор, благоприятствующий накоплению адаптивных аминокислотных различий и предложили статистический тест, основанный на сравнении этих показателей (тест МакДональда-Крейтмана, МК) для оценки интенсивности действия отбора. Для проведения этого теста вычисляют фиксированные отличия (fixed differences – те позиции выравнивания, которые консервативны внутри каждого вида, но полиморфны между двумя видами) и полиморфные сайты (polymorphisms – те позиции выравнивания, которые полиморфны внутри одного из видов или внутри обоих видов). Все замены классифицируются как синонимичные (не меняющие

аминокислотную последовательность) или несинонимичные (меняющие аминокислотную последовательность). Получается четыре числа: d – число синонимичных полиморфных сайтов, c – число синонимичных фиксированных отличий, b – число несинонимичных полиморфных сайтов, a – число несинонимичных фиксированных отличий.

Согласно гипотезе нейтральности, мутации в последовательностях накапливаются с постоянной скоростью, независимо от того, приводит ли это к расхождению видов, и, поэтому, соотношение синонимичных/несинонимичных замен среди фиксированных отличий и полиморфных сайтов должно совпадать. Если все несинонимичные различия нейтральны, то $a/c=b/d$. Если некоторые несинонимичные различия между видами были полезны и поддерживались отбором, то $a/c>b/d$. Статистическая достоверность теста была оценена с помощью точного теста Фишера.

Результаты сравнения последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* *A.thaliana* и *A.lyrata* представлены в табл. 13. Для *ICE1* выявлено достоверное ($P<0.05$) превышение внутривидового несинонимичного полиморфизма над межвидовым, что может говорить о стабилизирующем или о балансирующем отборе. Для *ICE2* несинонимичные замены внутри вида встречаются почти с той же частотой, что и между видами, то есть не было выявлено следов действия отбора, однако статистическая достоверность не была поддержана тестом Фишера, поэтому мы применили также другие тесты для анализа.

Таблица 13. Результаты теста МакДональда-Крейтмана и индекс нейтральности.

Ген	Фиксированные различия		Полиморфные сайты		Точный тест Фишера, P-value	NI
	Синонимичные сайты	Несинонимичные сайты	Синонимичные сайты	Несинонимичные сайты		
<i>ICE1</i>	223	503	4	27	0.04*	2.993
<i>ICE2</i>	22	35	12	24	0.66	1.257

* $0.01 < P < 0.05$

Индекс нейтральности (neutrality index, NI) - это соотношение внутривидового несинонимичного и синонимичного полиморфизма (π_a/π_s) к межвидовому (K_a/K_s). При допущении, что «молчащие» замены являются нейтральными мутациями, $NI > 1$ указывает на стабилизирующий отбор,

приводящий к избытку внутривидового аминокислотного полиморфизма, значение $NI < 1$ указывает на действие движущего отбора на ген. Для *ICE1* и *ICE2* значения NI составили 1,257 и 2,993, соответственно (табл. 13). Это говорит о том, что на ген *ICE1* испытывал сильное давление стабилизирующего отбора, давление отбора на ген *ICE2* было низким.

Гетерогенность распределения соотношения внутривидового полиморфизма к дивергенции последовательности между видами может быть результатом различного действия отбора на участки гена (McDonald, 1996). Статистический тест МакДональда на гетерогенность, основанный на соотношении полиморфизма и фиксированных между видами различий (McDonald, 1996; McDonald, 1998) был применен с помощью программы DNA Slider (McDonald, 1998), которая оценивает уровень внутривидового полиморфизма к дивергенции по методу движущегося окна по всей последовательности гена. Для межвидового сравнения использовались ортологи генов из *A. lyrata*. Этот тест использует несколько статистик для оценки гетерогенности, наиболее важные из них - G_{max} (maximum sliding G statistic), G_{mean} (mean sliding G statistic), K_R (runs statistic) и D_{KS} (Kolmogorov-Smirnov statistic). Наименьшие и наивысшие значения отношения полиморфизма к дивергенции сопровождаются наибольшими значениями статистик теста. Гипотеза о существовании гетерогенности считается принятой, если значения P-value для статистики < 0.05 , однако значения $0.05 < P < 0.07$ также необходимо принимать к сведению (McDonald, 1998).

В табл. 14 представлены результаты по этим четырем статистикам. Видно, что для гена *ICE1* гипотеза гетерогенности отвергается, а для *ICE2* две статистики, K_R и D_{KS} , не достоверны, однако значимы. Следовательно, существует некоторая гетерогенность в распределении отношения полиморфизма к дивергенции (π/K). Анализ этого распределения по гену методом движущегося окна выявил область низкого отношения полиморфизма к дивергенции в районе домена bHLH, который может являться мишенью действия стабилизирующего отбора. Пики высокого отношения полиморфизма к дивергенции располагаются в АСТ-подобном, ZIP доменах, а также в варибельной части 1 экзона в районе 953-го нуклеотида, не относящейся к известным доменам (Приложение, рис. 3).

Таблица 14. Результаты теста Макдональда на гетерогенность распределения отношения полиморфизма к дивергенции. Для каждого теста было проведено 1000 симуляций с рекомбинационными параметрами (R) = 1, 2, 4, 8, 16, 32, в таблице приведено наибольшее полученное P-value.

Ген	P			
	G _{mean}	G _{max}	K _R	D _{KS}
<i>ICE1</i>	0.16	0.16	0.96	0.23
<i>ICE2</i>	0.177	0.118	0.063	0.076

Оценка отклонений наблюдаемого полиморфизма нуклеотидов от нейтральности с помощью теста Таджимы оценивает спектр аллельных частот и оценивает вклад редких аллелей в полиморфизм (Таджима, 1989). Показатель D был немногим больше нуля для кодирующей последовательности генов *ICE1* и *ICE2* (табл. 10 и 11) и достоверных отклонений от нейтральной гипотезы эволюции не было выявлено. Однако при использовании метода скользящего окна достоверные отрицательные значения D были получены для 5'-НТР и домена bHLH у обоих генов. Это указывает на избыток низкочастотного полиморфизма, что, скорее всего, является указанием на стабилизирующий отбор. Положительные значения D наблюдались в районах гена *ICE2*, для которых тест МакДональда выявил высокое отношение полиморфизма к дивергенции: АСТ-подобном, домене ZIP и области 953-го нуклеотида, а также 3'-НТР. Это может указывать на наличие балансирующего отбора.

Таким образом, использованные нами тесты на нейтральность молекулярной эволюции позволили установить, 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.

3.6. Изучение функции гена *ICE2* с использованием трансгенных растений

Изучение трансгенных растений, суперэкспрессирующих определенный ген под контролем конститутивного промотора, служит ценным инструментом обратной генетики, позволяющим оценить фенотипический эффект избыточной дозы гена и, таким образом, пролить свет на роль гена в организме. Подобная работа ведется в ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН под руководством д.б.н.,

профессора В.А. Тарасова, и наша группа глубоко признательна за предоставление семян трансгенных растений поколения T2.

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

Две гомозиготные по инсерции T-ДНК линии, D7 и D14, несущие одну копию 35S:*ICE2* в геноме, были выделены из поколения T5 (см. Материалы и Методы). Суперэкспрессия гена *ICE2* была подтверждена методом ПЦР-РВ. Относительный уровень экспрессии *ICE2* оказался значительно выше в апикальных меристемах и листьях двухнедельных трансгенных растений по сравнению с ДТ (раса Columbia). В растениях линии D7 наблюдали повышение экспрессии в 7-11 раз, в линии D14 – в 35-60 раз (рис. 17).

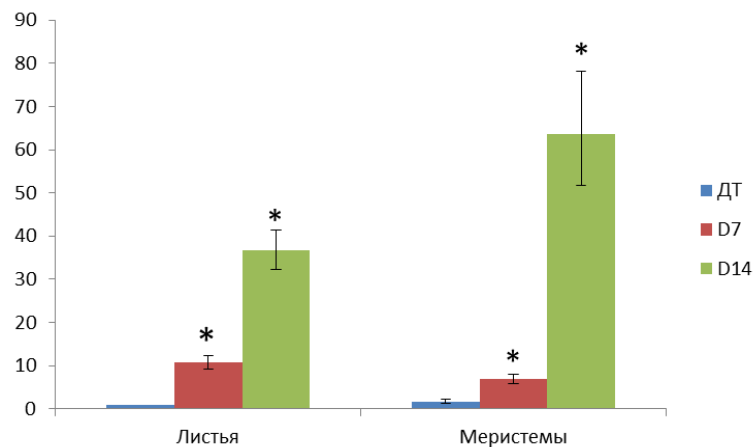


Рис. 17. Анализ экспрессии гена *ICE2*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ. Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. * выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии ДТ (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

Трансгенные растения характеризовались несколько заторможенным ростом и зацветали позже растений ДТ (рис. 18А), других отклонений морфологии и развития не наблюдалось. Поскольку ранее было показано, что Ген *ICE2/SCRM2* участвует в регуляции развития устьиц (мутация в этом гене приводила к нарушениям устьичной дифференцировки (Kanaoka et al., 2008), мы также методом сканирующей электронной микроскопии у трансгенных и контрольных растений изучили абаксиальную (нижнюю) поверхность листьев, где сосредоточены устьица.

Плотность расположения устьиц ($SD, \text{п}/\text{мм}^2$) и эпидермальных клеток ($ED, \text{п}/\text{мм}^2$) оказалась ниже у растений трансгенных линий (данные не представлены), что говорит об увеличенном размере клеток у трансгенных растений. Однако процент числа устьиц, оцененный с помощью показателя SI (stomata index), который позволяет нивелировать различия в размерах клеток, значительно выше у трансгенных растений (рис. 18В). Количественные и морфологические параметры устьиц представлены на рис. 18В.

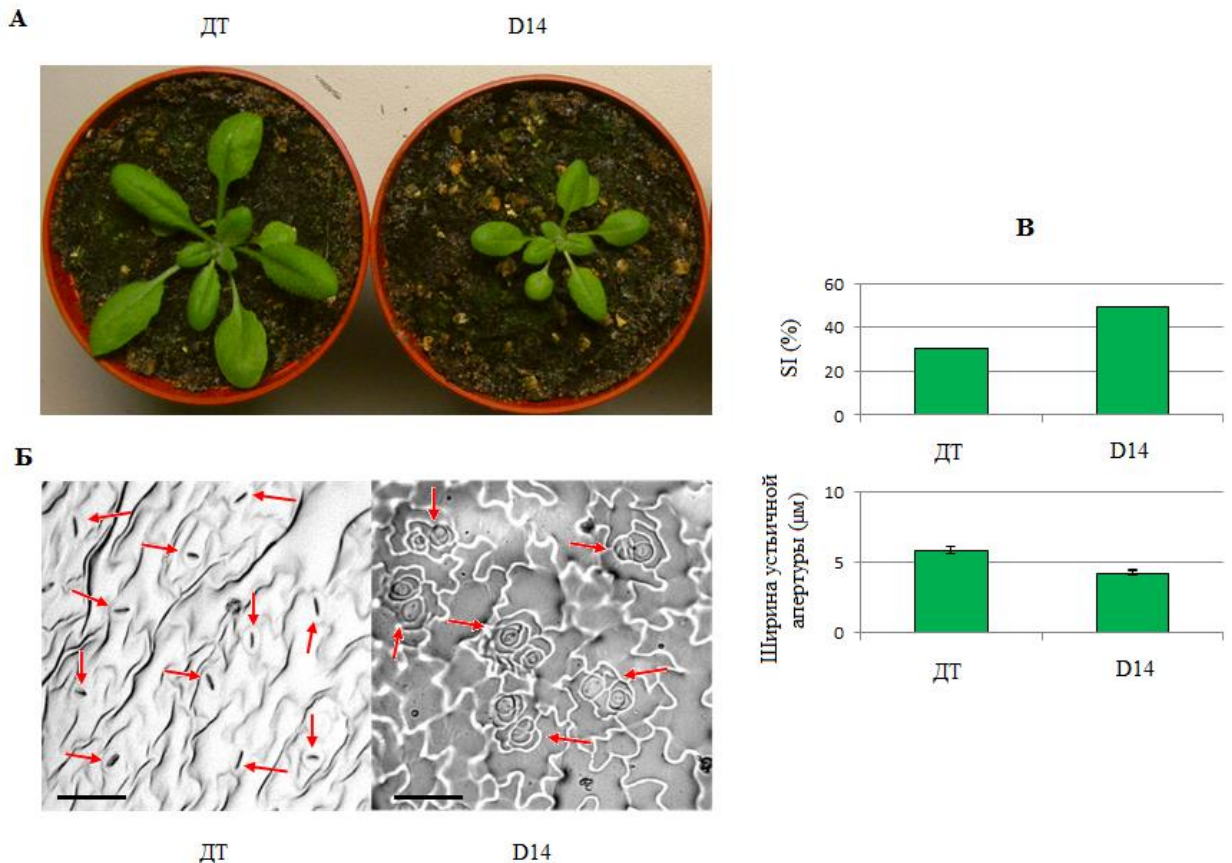


Рис. 18. Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на фенотип трансгенных растений. (А) Задержка роста трансгенных растений по сравнению с ДТ. (Б) Сканирующая электронная микрофотография абаксиальных поверхностей листьев. Стрелками выделены нормальные устьиц (ДТ) и недоразвитые устьица (D14). Бар = 30 μm . (В) Характеристики морфологии и кластеризации устьиц. Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего измерений 50 устьиц.

Кроме того, у трансгенных растений были обнаружены морфологические аномалии: многочисленные недоразвитые меристемоиды (предшественники замыкающих клеток устьиц) и устьица на разных стадиях развития, нарушено развитие и кластеризация устьиц (рис. 18Б). Эти данные согласуются с

установленной ролью ICE2 в развитии устьиц (Kanaoka et al., 2008). Устьица трансгенных растений также имеют меньший размер устьичной апертуры (среднее значение $3.95 \pm 0.5 \mu\text{m}$) по сравнению с ДТ (среднее значение $5.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$), при равных условиях выращивания и фиксирования (рис. 18В). В норме АБК индуцирует закрывание устьиц для предотвращения водных потерь (Hetherington, 2001). Следовательно, наблюдаемое явление может указывать на измененную регуляцию проводимости устьиц вследствие повышенного содержания АБК или чувствительности к ней в листьях трансгенных растений.

3.6.2. Реакция трансгенных растений на холодовой стресс

ICE1 играет важную роль в устойчивости *A.thaliana* к холоду (Chinnusamy et al., 2003; Lee et al., 2005; Miura et al., 2007; Miura and Hasegawa, 2008; Miura et al., 2011). Предыдущими исследованиями было показано, что акклиматизированные трансгенные растения линии *Super-Half2-ICE2* поколения T2 также обладали повышенной устойчивостью к кратковременному (1 час) замораживанию при -20°C (2). Однако тест на утечку электролитов, являющийся классическим физиологическим тестом, позволяющим оценить устойчивость растения к холоду, не выявил различий между трансгенными растениями D7, D14 и ДТ, как неакклиматизированных, так и акклиматизированных (Kurbidaeva et al., 2014). Анализ баз данных микроэррей показал, что *ICE2* может специфично экспрессироваться в меристемах. Поэтому возникло предположение о неких специфичных функциях гена в меристемах. Был проведен физиологический тест на устойчивость линий D7 и D14 к замораживанию при -5°C . Использовалось по 50 проростков каждой линии в трех биологических повторностях. Выживаемость растений ДТ составила 36%, трансгенных растений линии D7 – более 80%, D14 – более 90% (рис. 19Б). Только небольшой процент трансгенных растений выжил полностью, в большинстве случаев выжили только апикальные меристемы, листья оказались повреждены холодом и погибли (рис. 6А).

По данным GENEVESTIGATOR, ген *ICE2* наиболее сильно экспрессируется в апикальных меристемах и замыкающих клетках устьиц, в то время как экспрессия *ICE1* максимальна в эндосперме (рис. 19В). Для подтверждения этих данных была изучена экспрессия генов *ICE1* и *ICE2* в меристемах и листьях растений ДТ

методом ПЦР-РВ. В листьях экспрессия гена *ICE2* оказалась примерно в 2,6 раза ниже, чем меристемах, экспрессия *ICE1* значимо не различается в этих органах (рис. 19Г). Таким образом, *ICE2* экспрессируется в меристемах на более высоком уровне. В трансгенных растениях промотор 35S приводит к эктопической экспрессии гена во всех тканях (рис. 17), однако это приводит к повышенной устойчивости именно меристем. Таким образом, возможно, в меристеме существуют специфичные кофакторы, которые опосредуют роль гена в регуляции холодового ответа.

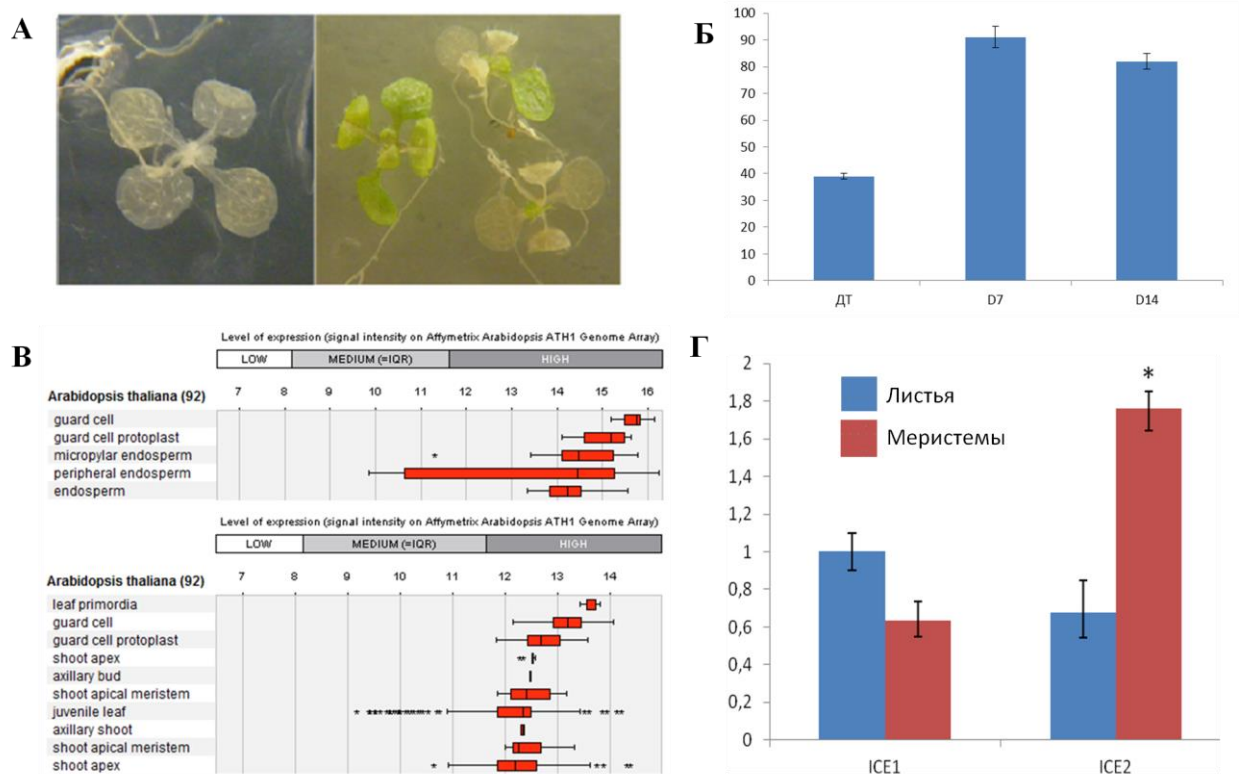


Рис. 19. *ICE2* контролирует устойчивость меристемы к холоду. (А) Влияние суперэкспрессии of *ICE2* на устойчивость к замораживанию. (Б) Процент выживаемости растений ДТ и трансгенных линий после замораживания. Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. (В) Относительная экспрессия гена *ICE2* в различных органах *A.thaliana* по данным микроэррей из БД GENEVESTIGATOR. (Г) Анализ экспрессии генов *ICE1* и *ICE2* в листьях и меристемах 14-дневных проростков ДТ. 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 в листьях (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

3.6.3. Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на экспрессию генов регулона *CBF/АБК-независимого* пути ответа на холод

Для установления причин повышенной устойчивости меристем к холоду и характеристики роли гена *ICE2* в системе холодового ответа был проведен анализ экспрессии генов холодового ответа методом ПЦР-РВ. Так как было замечено, что меристемы побегов выживают после холодового воздействия, несмотря на гибель листьев, было использовано два вида тканей для анализа. Для детального изучения роли гена *ICE2* в контроле *CBF*-зависимого пути ответа на холод, была изучена экспрессия генов *CBF* через определенные промежутки времени после начала стресса. Известно, что гены *CBF1-3* быстро и на короткий срок индуцируются в течение первых часов холодового воздействия (Gilmour et al., 2004). Пик экспрессии гена *CBF1* произошел через 6-9 часов (рис. 20), при этом в меристемах и листьях трансгенных растений пик был значительно выше, чем в ДТ (рис. 20). Эти данные подтверждают полученные ранее Fursova et al., 2009. Экспрессия *CBF2* достигла пика через 3-6 часов, при этом не было различий между линиями (рис. 20). Экспрессия *CBF2* достигла пика через 6 часов, при этом в меристемах трансгенных линий экспрессия была выше (рис. 20). В работе Fursova и др. (2009) не было отмечено разницы по экспрессии этого гена, возможно причиной послужило использование только одного типа тканей для анализа.

Мишенями действия ТФ семейства *CBF* являются гены *COR*, играющие главную роль в защите клеток от повреждения холодом (Thomashow, 1999). Для анализа экспрессии было выбрано три гена: *COR15a*, *COR47 (RD17)*, *COR78 (RD29A)*. Максимальный уровень экспрессии отмечался через 24 часа воздействия в ДТ и трансгенных растениях, однако в меристемах этот пик был значительно выше в трансгенных линиях (рис. 20). 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.

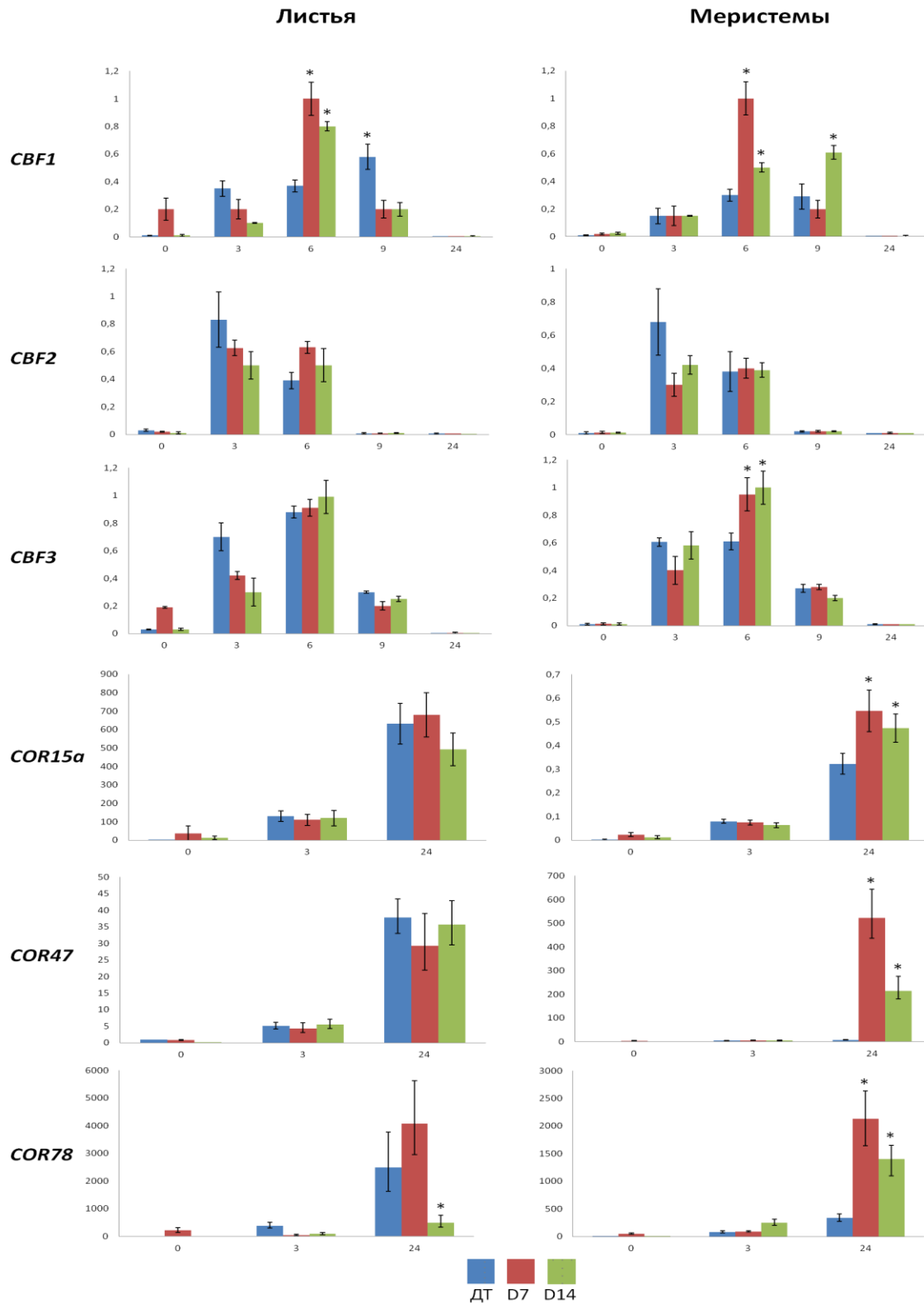


Рис. 20. Влияние гипотермии (4°C) на уровень экспрессии генов регулона *CBF* в 14-дневных проростках *A.thaliana*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч). Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. * выделены статистически достоверные отличия от ДТ (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

Недавно было установлено, что субъединицы медиаторного комплекса *SFR6/MED16*, *MED2* и *MED14* участвуют в контроле экспрессии генов *COR* путем привлечения хроматин-ремоделирующего комплекса и РНК-полимеразы II к проморам генов *COR* (Hemsley et al., 2014). Анализ относительного содержания транскриптов генов этих белков в меристемах и листьях показал, что гены *SFR6* и *MED2* экспрессируются на повышенном уровне в меристемах как ДТ, так и трансгенных линий (рис. 21). Эти данные были также подтверждены данными микроэрей из БД Arabidopsis e-FP Browser (Приложение, рис. 5).

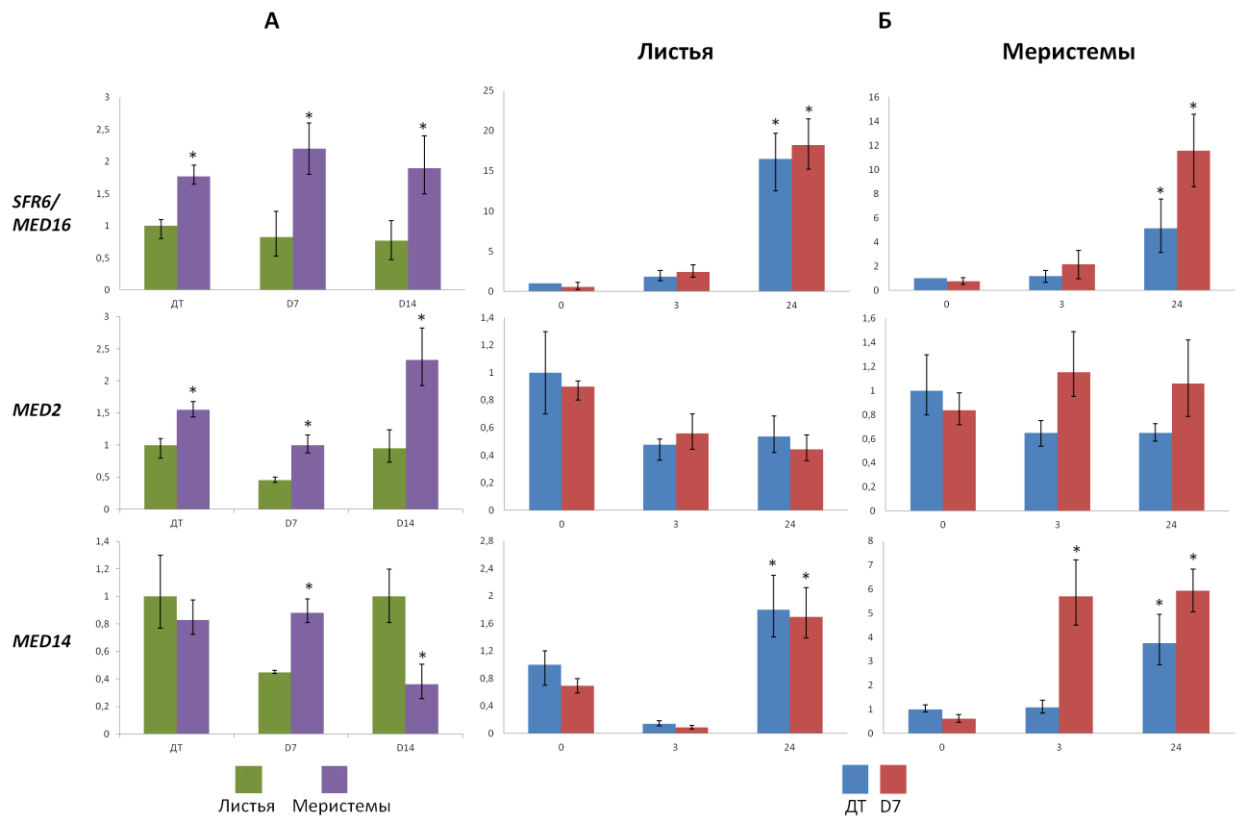


Рис. 21. Анализ экспрессии генов субъединиц медиаторного комплекса (А) при нормальных условиях; (Б) при 4⁰С. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч). Значения представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. * выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии в листьях (А) и от экспрессии при н.у. (Б) (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

Анализ накопления транскриптов под действием холода показал, что ген *SFR6* активируется холодом в листьях и меристемах, а *MED14* – значимо только в меристемах, однако нет статистически достоверных различий между трансгенными

растениями и ДТ (рис. 21). Таким образом, в активации экспрессии генов COR специфически в меристемах трансгенных растений могут участвовать субъединицы медиаторного комплекса SFR6, MED2 и MED14., поскольку кодирующие их гены экспрессируются в меристемах на более высоком уровне.

3.6.4. Влияние суперэкспрессии гена *ICE2* на АБК-зависимый путь ответа на холод/экспрессию генов метаболизма АБК и регулона *AREB/ABF*

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.

Экспрессия гена *NCED3* была выше в листьях и меристемах трансгенных растений по сравнению с ДТ (рис. 22), однако холод по-разному действовал на экспрессию в разных тканях. В листьях трех линий и в меристемах ДТ уровень экспрессии практически не изменялся, было отмечено небольшое понижение. Однако в меристемах трансгенных растений наблюдалась активация экспрессии *NCED3* (рис. 22). Разный уровень базальной экспрессии *NCED3* можно объяснить существованием регуляции по типу обратной связи между содержанием АБК в тканях и экспрессией генов синтеза АБК (Barrero et al., 2006). Экспрессия гена *ABA1* повышалась незначительно в листьях и меристемах (рис. 22). Экспрессия гена *CYP707A2* повышалась в меристемах трансгенных растений и ДТ, в листьях линии D7 наблюдалась наибольшая активация (рис. 22). Таким образом, суперэкспрессия *ICE2* положительно влияет на стресс-индуцируемую экспрессию гена синтеза АБК *NCED3* в меристемах.

Экспрессия генов дегидринов в листьях значительно повышается после 24 часов при низкой температуре (рис. 22). В трансгенных растениях максимальный уровень экспрессии не отличается от ДТ, либо меньше (*RD29B*). В меристемах мы наблюдали индукцию экспрессии генов *RD29B* и *RAB18*. В трансгенных растениях

уровень экспрессии после 24 часов был выше, чем в ДТ (рис. 22). Экспрессия гена *ADH* повышается значительно в листьях и меристемах после 24 часов воздействия. В трансгенных растениях уровень транскрипции выше, чем в ДТ. Наиболее значительная индукция (в 4000 раз) наблюдалась в меристемах растений линии D7 (рис. 22). Таким образом, 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.

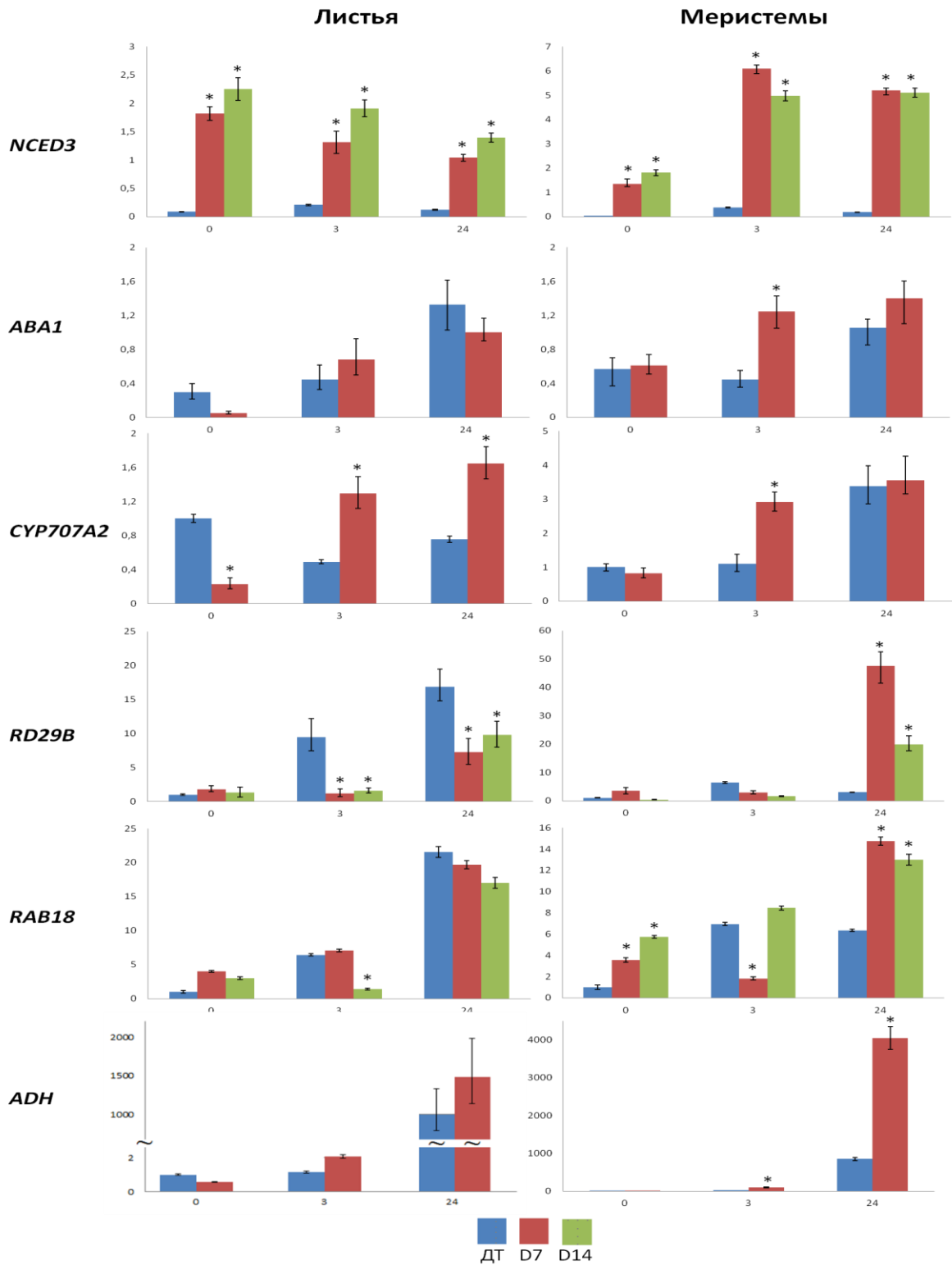


Рис. 22. Влияние гипотермии (4°C) на уровень экспрессии генов метаболизма АБК и АБК-зависимых генов устойчивости в 14-дневных проростках *A.thaliana*. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена относительно ДТ в нормальных условиях. По оси X – продолжительность стрессового воздействия (ч). Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего двух биологических повторов. * выделены статистически достоверные отличия от ДТ (t-тест Стьюдента, уровень значимости 5%).

3.7. Роль гена *ICE2* в адаптации к условиям северной границы ареала обитания *A. thaliana*

Для того 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 6 популяций из Республики Карелия. Территория Карелии принадлежит к крайней северной границе ареала вида. Самые северные популяции обнаружены в Карелии на широте 62°54' (Федоренко и др., 2001). В таких приграничных районах популяции испытывают давление неблагоприятных для вида экологических условий. Среднегодовая температура в регионе составляет от +1,5°C (на севере) до +3°C (на юге), с продолжительной зимой (средняя температура января -11°C) и коротким прохладным летом (средняя температура июля +15°C). В качестве контроля были использованы растения расы Dj-M (Франция) (среднегодовая температура в регионе +13°C, июля +19,7°C, января +1,6°C) и расы Cvi-0 с тропических Островов Зеленого Мыса (среднегодовая температура +24°C, июля +25°C, января +22°C).

Растения подвергали воздействию +4°C в течение суток. Измерялась относительная экспрессия генов двух основных пути ответа растений на холодовой стресс. Понижение температуры приводит к активации гена *NCED3*, отвечающего за биосинтез АБК, которая активирует действие генов транскрипционных факторов и защитных белков, таких как *RD22* и *RD29B*. Холод может активировать работу генов без посредства АБК. Ключевые регуляторы - гены транскрипционных факторов семейства *ICE*, *CBF* и их мишени – гены дегидринов семейства *COR*.

Стресс привел к значительному повышению экспрессии гена *NCED3* и *RD29B* (рис. 23), что согласуется с известными из литературы данными. Кроме того, выявлена положительная корреляция уровней экспрессии этих генов. Однако статистически достоверные различия от Dj-M в экспрессии *NCED3* обнаружены только у двух рас (рис. 23). Не было выявлено разницы между уровнем экспрессии при нормальных условиях и после стресса генов *NCED3*, *RD22* и *RD29B* в растениях изученных рас. Полученные данные позволяют предполагать, что АБК-зависимый путь участвует в регуляции холодового ответа, однако не играет ключевой роли в адаптации к условиям севера.

Экспрессия гена *ICE1* достоверно не отличается у растений разных рас (рис. 3). Экспрессия гена *ICE2* оказалась выше в 2,5 – 4 раза у растений карельских рас по сравнению с расами Dj-M и Cvi-0 на всех проанализированных стадиях развития. Интересно отметить, что наибольший уровень экспрессии (в 5 раз) отмечен у растений популяции Медвежьегорск, самой северной из исследованных. Наименьший уровень экспрессии – в 2,3 раза – у растений популяции Царевичи, среди которых преобладают раннецветущие растения. В то же время, экспрессия гена *ICE1* значимо не отличается у растений разных рас. Экспрессия гена *COR15A* при нормальных условиях достоверно выше в 3-5 раз у растений рас Климецкий, Радколье и Кончезеро по сравнению с Dj-M, Климецкий и Медвежьегорск, у растений расы Cvi-0 она ниже в 10 раз. Холод приводит к значительной активации экспрессии, примерно в 65 раз у Cvi-0, 160 раз у Dj, и в 300-500 раз у северных популяций (рис. 23). Корреляционный анализ с уровнем значимости 90% показал, что уровни экспрессии генов *ICE2* и *COR15a* положительно коррелируют (коэффициент корреляции +0,73).

Таким образом, АБК-независимый путь принимает участие в адаптации северных растений к стрессовым условиям. Ген *ICE1* является известным регулятором холодового ответа (Chinnusamy et al., 2003), однако нельзя говорить о его ведущей роли в адаптации северных рас. Важную роль в устойчивости растений карельских рас может играть ген *ICE2*. Ранее при сравнении экотипов из разных климатических зон была показана связь между широтой произрастания и уровнем экспрессии генов регулона *CBF/DREB* (генов транскрипционных факторов *CBF* и дегидринов *COR*). У растений северных экотипов наблюдалась более сильная индукция холодом этих генов (Lin et al., 2008; McKhann et al., 2008). Возможно, что именно этот путь холодового ответа, не связанного с действием АБК, играет основную роль в устойчивости к холоду и в растениях карельских популяций.

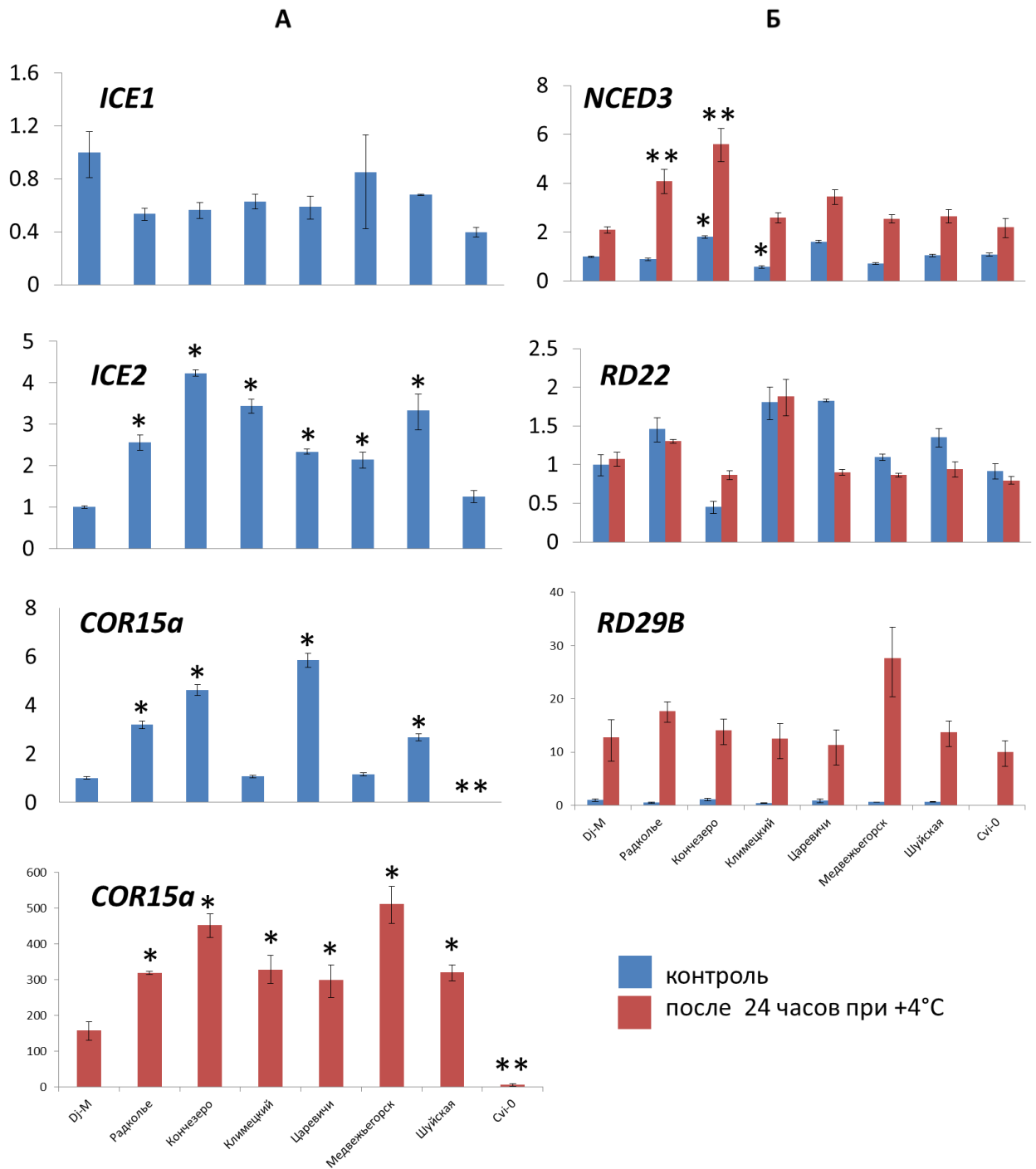


Рис. 23. Относительный уровень экспрессии генов: А – АБК-зависимого пути ответа на холод, Б– АБК-независимого. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена. За единицу принят уровень транскрипции гена в Dj-M без холодового воздействия. Значения представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. * и ** выделены статистически достоверно отличные от Dj-M группы (однофакторный дисперсионный анализ, уровень значимости 1%).

3.8. Изучение связи экспрессии *ICE2* с регуляцией времени зацветания

При работе с трансгенными растениями, суперэкспрессирующими *ICE2*, а также с расами из различных климатических зон было 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 ранозацветающих природных популяциях *A. thaliana* и трансгенных линиях. Растения естественных популяций *A. thaliana* считаются раннецветущими, если зацветают в течение 28–75 дней от прорастания. Без предварительной холодной обработки семян растения популяций Радколье, Климецкий, Кончезеро, Шуйская, Медвежьегорск зацветают через 90–180 дней (Федоренко и др., 2012). Популяция Царевичи является полиморфной по времени цветения. Она представлена и позднецветущими, и относительно раннецветущими формами (Федоренко и др., 2012). Это подтверждает, что самые поздние (озимые) экотипы *A. thaliana* часто произрастают в самых северных регионах (Kranz and Kirchheim, 1987), поскольку имеют селективное преимущество в условиях короткого и холодного лета по сравнению с раннецветущими формами. Анализ нуклеотидных последовательностей позволил заключить, что позднее цветение растений карельских популяций контролируется, вероятно, функционально активными аллелями генов *FRI* и *FLC*, задерживающими цветение (Курбидаева и др., 2013). Растения расы Dj-M имеют делецию в регуляторной области гена *FRI* и характеризуется ранним зацветанием, раса Cvi-0 имеет функционально активный аллель *FLC*, приводящий к более позднему зацветанию (Gazzani et al., 2003).

В связи с этим была исследована экспрессия генов, отвечающих за контроль времени зацветания: *FLC* и *SOC1*. Установлено, что ген *FLC* у растений всех популяций Карелии экспрессировался на более высоком уровне по сравнению с ранозацветающими растениями расы Dj-M (рис. 24). В растениях популяции Царевичи, которая отличается от других карельских популяций более ранним зацветанием, уровень экспрессии *FLC*, оказался ниже, чем у остальных карельских популяций, но выше в 6 раз, чем у расы Dj-M и примерно в 2 раза ниже, чем у расы

Cvi-0. У экотипа Cvi-0 уровень экспрессии *FLC* несколько выше, чем у Dj-M, что объясняет чуть более позднее, чем у Dj-M, время зацветания растений Cvi-0. Следовательно, в нашем исследовании, как и в ранее проведенных работах (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon et al., 2000), выявлена связь между уровнем экспрессии гена *FLC* и временем цветения растений. Эта связь подтверждается и анализом корреляции между уровнем экспрессии *FLC* и числом листьев розетки у растений исследованных популяций и экотипов (при уровне значимости 90%, коэффициент корреляции 0.75).

У растений Dj-M и Cvi-0, имеющих сравнительно низкий уровень экспрессии *FLC*, выявлен высокий уровень экспрессии гена *SOC1*, который активирует цветение. Выявлена отрицательная корреляция между уровнем экспрессии *SOC1* и числом листьев в розетке (уровень значимости 99%, коэффициент корреляции – 0,98). И наоборот, в растениях позднозацветающих КП с высоким уровнем экспрессии *FLC* уровень экспрессии *SOC1* оказался в 5–20 раз ниже, чем у Dj-M (рис. 24). Этот ген подвержен негативной регуляции со стороны *FLC* (Seo et al., 2009), что и подтверждают полученные данные. Кроме того, показано, что *SOC1* участвует в репрессировании ряда генов холодового ответа (Seo et al., 2009), следовательно пониженная экспрессия гена может влиять и на устойчивость к холоду рас.

Полученные данные позволили нам выдвинуть предположение, что гены холодового ответа могут влиять на регуляцию цветения путем активации экспрессии *FLC* или репрессии *SOC1*. Мы попытались проверить эти теории путем анализа трансгенных растений.

Анализ экспрессии генов *FLC* и *SOC1* в D7 и D14 по сравнению с ДТ показал, что в более поздно зацветающих трансгенных линиях уровень транскрипции флорального индуктора *SOC1* понижен значительно (рис. 24). Как в ДТ, так и в трансгенных растениях уровень транскрипции *SOC1* в меристемах значительно выше, чем в листьях, что согласуется с известными данными о паттернах экспрессии *SOC1* (Immink et al., 2012). Транскрипция репрессора цветения *FLC* достоверно не отличалась в трансгенных растениях по сравнению с ДТ (рис. 24). Известно, что *SOC1* участвует в репрессировании ряда генов холодового ответа, в частности *CBF* (Seo et al., 2009). Наши данные говорят о том, что возможно

существует и обратная связь: гены холодового ответа, в частности *ICE2*, могут репрессировать *SOC1*. Таким образом, пониженная экспрессия *SOC1* может быть связана и с повышенной устойчивостью к холоду, и с более поздним зацветанием трансгенных растений.

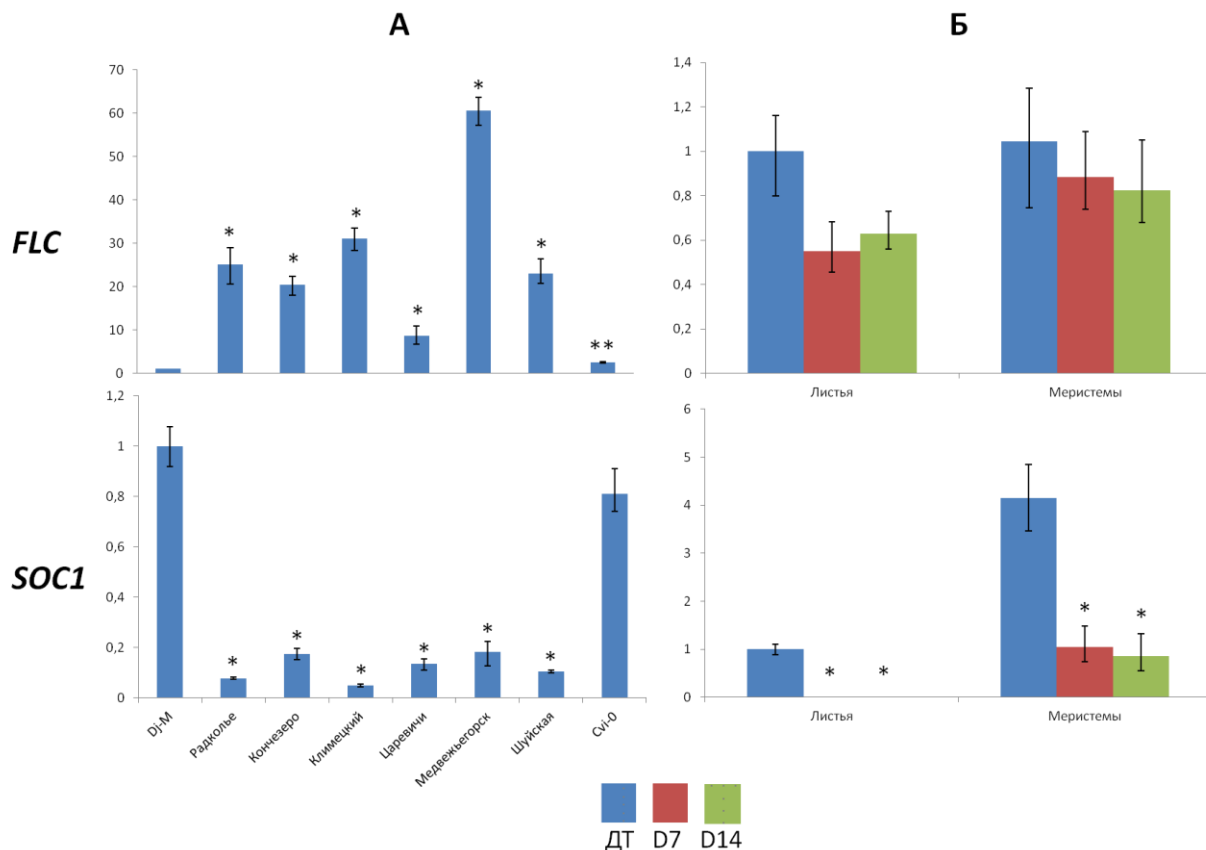


Рис. 24. Относительный уровень экспрессии генов, контролирующих цветение: А – в различных расах *A.thaliana*, Б– в трансгенных линиях. По оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена. За единицу принят: А - уровень транскрипции гена в Dj-M без холодового воздействия, Б – уровень транскрипции гена в ДТ (Columbia). Значения представлены в виде среднего арифметического±стандартная ошибка среднего двух биологических повторностей. * и **выделены статистически достоверно отличные от Dj-M группы (однофакторный дисперсионный анализ, уровень значимости 1%).

Суммируя эти данные с данными по карельским расам, мы подтверждаем наличие связи между генами ответа на холод и генами цветения и показываем, что *ICE2* также, по-видимому, является ее элементом, откладывая время зацветания путем репрессирования *SOC1*, а не активирования *FLC*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Роль гена *ICE2* в устойчивости к холоду апикальной меристемы побега

Установлено, что *ICE2* отвечает за устойчивость к холоду апикальных меристем. На этот вывод нас натолкнули результаты двух типов физиологических тестов. Тест на утечку электролитов из клеток листа после воздействия низких температур не выявил разницы между трансгенными растениями и ДТ (Kurbidaeva et al., 2014). Однако визуальная оценка выживаемости растений после замораживания при -5°C показала, что у трансгенных растений выживает апикальная меристема побега (Kurbidaeva et al., 2014). Уровень транскрипции гена в растениях ДТ выше в меристемах (рис. 19Г), что говорит о возможной регуляции на транскрипционном уровне; уровень транскрипции гена-гомолога *ICE1* в меристемах не отличается от экспрессии в листьях.

Однако повышенную устойчивость меристем трансгенных растений нельзя объяснить с позиции повышенной экспрессии гена в меристемах вследствие эктопического характера экспрессии *ICE2*. Изучение экспрессии генов ответа на холод в двух типах тканей показало, что в меристемах ряд таких генов экспрессируется на повышенном уровне и/или индуцируется холодом до более высокого уровня (рис. 20). Индуцируемая холодом экспрессия генов *CBF1* и *CBF3* выше в меристемах трансгенных растений по сравнению с ДТ. Экспрессия маркерных генов *CBF*-зависимого пути ответа на гипотермию, *COR*, также значительно выше в меристемах трансгенных растений (рис. 20). Тот факт, что в трансгенных линиях *ICE2* экспрессируется на высоком уровне во всех тканях и вызывает повышенную экспрессию *CBF1* как в листьях, так и в меристемах, однако только меристемы обладают повышенной устойчивостью к гипотермии, говорит о том, что в меристемах существуют специфические кофакторы, приводящие к посттранскрипционной или посттрансляционной модификации мРНК или белка *ICE2*. Мы установили, что роль таких кофакторов могут выполнять субъединицы медиаторного комплекса *SFR6*, *MED2* и *MED14* (рис. 25.). Гены *SFR6*, *MED2* и *MED14* экспрессируются на повышенном уровне в меристемах (*SFR6* и *MED2*) либо активируются холодом в меристемах (*MED14*, рис. 21). Кроме того, известно, что белок *ICE1* подвержен различным холод-индуцируемым посттрансляционным

модификациям, таким как фосфорилирование, убиквитинирование и сумоилирование (Dong et al., 2006; Miura et al., 2007; Miura et al., 2011). Возможно, подобная регуляция существует и для ICE2, однако доказательств пока не получено.

Повышенная устойчивость меристем к холоду может также являться результатом активации биосинтеза АБК в меристемах. Показано, что ген *NCED3*, кодирующий фермент биосинтеза этого гормона, индуцируется гипотермией только в меристемах растений ДТ и трансгенных линий (рис. 22). Однако в трансгенных растениях активация примерно в 3 раза сильнее, чем в ДТ, таким образом, ген *ICE2* влияет на данную активацию. Недавно было показано, что регуляция экспрессии гена *NCED3* в различных органах и тканях *A.thaliana* намного сложнее, чем это считалось ранее (Baron et al., 2012). Мы предполагаем, что *ICE2* может быть вовлечен в регуляцию *NCED3* (рис. 25.2). Экспрессия индуцируемых АБК генов (*RAB18*, *RD29B*, *ADH*) под действием гипотермии повышается в меристемах трансгенных растений значительно по сравнению с ДТ. Эти гены кодируют дегидрины (регулон AREB/ABF) и алкогольдегидрогеназу, следовательно, *ICE2* обеспечивает защиту от индуцируемого холодом обезвоживания нежных тканей апикальной меристемы, особенно чувствительных к дефициту воды.

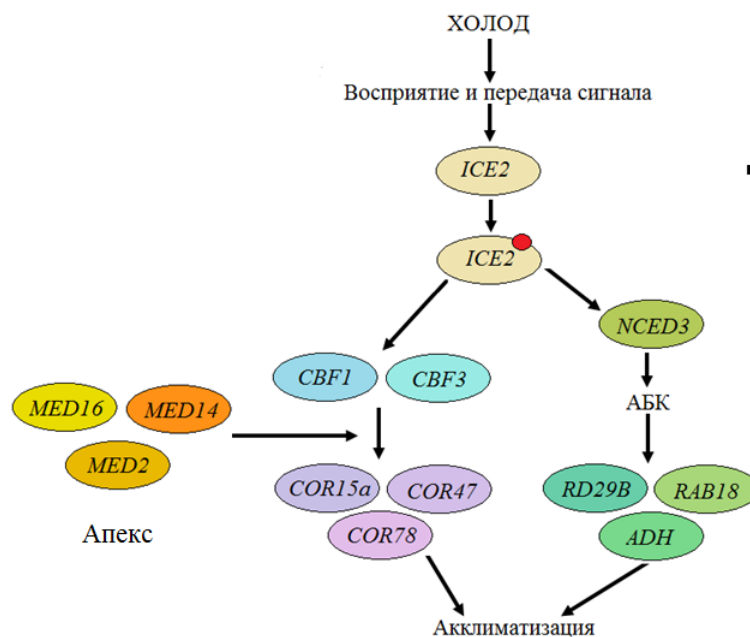


Рис. 25.2. Роль гена *ICE2* в регуляции устойчивости к холоду апикальных частей побега.

4.2. Возникновение гена *ICE2* в результате дупликации и его структурная и функциональная дивергенция

Эволюция функций генов – фундаментальная проблема современной биологии. Дупликации генов считают основным способом возникновения новых генов, что приводит в итоге к видообразованию (Ohno, 1970); дублированные гены присутствуют в геномах всех организмов архей, бактерий и эукариот (Zhang, 2003). Проведенный нами филогенетический анализ показал, что ген *ICE2* появился в результате дупликации гена *ICE1* примерно 17,9 Ма, произошедшей, вероятно, в одном из видов ранних Капустных, и значительно дивергировал структурно и функционально. Это предположение подтверждается анализом микросинтезии хромосом в районах генов *ICE1* и *ICE2*. Известно, что регуляторные гены, вовлеченные в регуляцию транскрипции и передачу внутриклеточного сигнала (ТФ, киназы, фосфатазы и кальций-связывающие белки), сохраняются в геноме после дупликации с большей долей вероятности (Seoighe and Gehring, 2004; Maere et al., 2005). Кроме того, среди относительно недавно дублированных генов преобладают гены, контролирующие ответ на стрессы (Kondrashov et al., 2002), что может быть вызвано их ролью в адаптации к условиям окружающей среды.

Гены *ICE1* и *ICE2* регулируют ответ на гипотермию (рис. 19; Chinnusamy et al., 2003), однако паттерны экспрессии этих генов говорят о том, что *ICE2* претерпел субфункционализацию и обеспечивает устойчивость к холоду специфически в меристемах. Показано, что в 85% случаев дупликации регуляторных генов *A.thaliana* у паралогов наблюдаются изменения паттернов экспрессии, что могло привести к суб- или неофункционализации и сыграло роль в сохранении паралогов после дупликации (Duarte et al., 2006). Исследования показали, что существует положительная корреляция между дивергенцией паттернов экспрессии гена в различных органах и под действием различных стрессов и дивергенцией последовательностей промоторов (Zou et al., 2009) и кодирующих областей гена (Wang et al., 2013). В промоторе гена *ICE2* мы обнаружили ряд цис-элементов, которые возможно участвуют в его меристем-специфичной экспрессии (табл. 8). Кроме того, анализ промоторной последовательности гена *ICE2* указывает на возможную роль в биотическом

стрессовом ответе. Таким образом, сдвиг экспрессии гена *ICE2* в область апикальной меристемы после дупликации мог сыграть роль в сохранении нового гена, его субфункционализации и, вероятно, появления новых функций.

В пользу последнего предположения говорит обнаружение различия в структуре кодирующей части генов *ICE*. *ICE2* приобрел новый белковый мотив в первом экзоне, состоящий из 19 а.о., и потерял специфичный для *ICE1* мотив (рис. 12). Известно, что изменения в кодирующей части гена приводят к изменению биохимических свойств его продукта, а значит, к потенциальному появлению новых функций, а мутации в регуляторной области могут влиять на паттерны пространственной и/или временной экспрессии гена, а также на его ответ на внутренние и внешние стимулы (Haberger et al., 2004; Wang et al., 2013). Меристема-специфичное действие *ICE2* может также быть результатом коэволюции специфичных факторов, участвующих в возможной посттрансляционной модификации белка или, как белки медиаторного комплекса MED2, 14, 16, в стресс-индуцируемой активации экспрессии генов устойчивости.

Кроме того, предполагается наличие у гена *ICE2* также новых относительно *ICE1* функций. В промоторе *ICE2* обнаружен ряд цис-элементов, связанных с биотическим стрессовым ответом (табл. 8). Ранее было показано, что суперэкспрессия гена в трансгенном табаке приводит к повышенной антимикробной активности гомогенизированных листьев (Tarasov et al., 2009). Активность была зафиксирована против некротрофных видов бактерий: *Erwinia carotovora* и *Pseudomonas syringae*. Известно, что эти микроорганизмы вызывают защитный иммунный ответ растения, опосредованный жасмоновой кислотой (Browse, 2009). Недавние исследования показали, что белки-репрессоры сигналинга жасмоновой кислоты JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) способны связываться с белками *ICE1* и *ICE2* и репрессировать их функции транскрипционной активации, а жасмоновая кислота повышает устойчивость к гипотермии (Hu et al., 2013). Суммируя эти данные, мы предполагаем, что ген *ICE2* может быть вовлечен в регуляцию ответа на биотический стресс через жасмонат-зависимый путь. Таким образом, изучаемый ген, возможно, имеет больше функций, чем предполагалось ранее.

Роль *ICE1* и *ICE2* в регуляции развития устьиц была установлена ранее

(Kanaoka et al., 2008). В нашей работе были обнаружены различия в морфологии, кластеризации и развитии устьиц между трансгенными растениями и ДТ (рис. 18). Повышенная плотность покрытия поверхности листа устьицами (SI) указывает на роль *ICE2* в инициации образования новых устьичных комплексов. Однако очевидно, что концентрация других необходимых для формирования устьиц ТФ недостаточна для успешной дифференцировки, что приводит к задержке развития на стадии меристемоидов. Наши данные подтверждают роль гена в регуляции развития устьиц и также в регуляции транспирации/проводимости устьиц путем влияния на устьичную апертуру.

На примере трансгенных растений и растений северных рас также прослеживается связь между уровнем экспрессии *ICE2* и временем зацветания растения. Установлено, что расы с повышенным уровнем экспрессии *ICE2*, так же как и трансгенные растения с суперэкспрессией гена, зацветают позднее растений ДТ с более низким уровнем экспрессии *ICE2* (рис. 24). Изучение трансгенных растений показало, что *ICE2* негативно влияет на экспрессию активатора цветения *SOC1* (рис. 24). Этот ген известен как связующее звено между генными сетями, регулирующими цветение и ответ на холод. *SOC1* действует как репрессор транскрипции генов *CBF* путем связывания с цис-элементами CArG в их промоторе (Seo et al., 2009), а также репрессирует ряд других ТФ холодового ответа, в частности *GNC* и *GNL* (Richter et al., 2013). Гены *CBF* активируются холодом и активируют экспрессию *FLC*, который в свою очередь негативно регулирует гены цветения, что приводит к его задержке. Таким образом, подтверждается связь между генами ответа на холод и генами цветения и показываем, что *ICE2* также, по-видимому, является ее элементом, откладывая время зацветания путем репрессирования *SOC1*, а не активирования *FLC* (рис. 26). Мы предполагаем, что интеграция ответа на холодовой стресс, времени цветения, развития устьиц и их проводимости могут быть важными в контексте оптимальной адаптации растения к различным условиям окружающей среды.

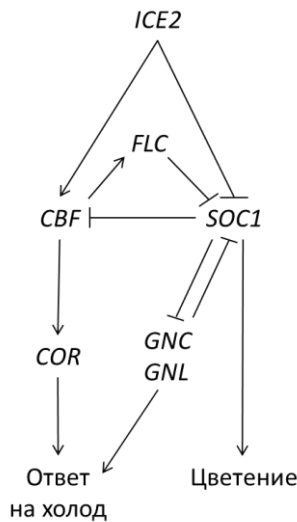


Рис. 26. Предполагаемая взаимосвязь между ответом на холод и регуляцией времени зацветания (схема суммирует наши данные с данными Seo et al., 2009; Richter et al., 2013).

4.3. Филогения семейства Капустные и роль гена *ICE2* в появлении адаптаций и дивергенции таксонов

Семейство Капустные (лат. Brassicaceae) дивергировало от других представителей порядка Капустоцветных (лат. Brassicales) приблизительно 24-40 миллионов лет назад (Franzke et al., 2011). В настоящее время существуют два основных сценария дальнейшей эволюции Капустных. Franzke et al. 2009 предположили, что современные засухоустойчивые Капустные отделились примерно 19 миллионов лет назад от более влаголюбивых предковых семейств Клеомовые (лат. Cleomaceae) и Каперсовые (лат. Capparidaceae), что произошло в восточном Средиземноморье. Дивергенция Капустных происходила 11 миллионов лет назад в новые экологические ниши, возникшие в ходе климатических изменений в Миоцене. Альтернативная теория была предложена Couvreur и др. Основываясь на данных о темпах молекулярной эволюции, исследователи предположили, что семейство возникло в Эоцене примерно 37 миллионов лет назад. В те времена на Земле господствовал теплый и влажный климат (Zachos et al. 2001). Поэтому Капустные предположительно возникли как тропическое/субтропическое семейство, как и его ближайшие родственники Клеомовые и Каперсовые, которые и сейчас в значительной мере представлены тропическими видами (Couvreur et al., 2010).

Регионом происхождения семейства считают Ирано-Туранскую флористическую область, а конкретнее – территорию современной Турции, где в настоящее время наблюдается наибольшее видовое разнообразие (Franzke et al., 2011). Быстрому образованию родов и видов способствовало глобальное похолодание, произошедшее

между Поздним Эоценом и Ранним Олигоценом (примерно 33 миллиона лет назад) (Zachos et al. 2001). Это событие способствовало развитию листопадной и более засухоустойчивой флоры в Европе, приведшее к многочисленным вымираниям более «влаголюбивых» клад (Morley, 2003). Примерно в это же время произошли базальные Капустные (примерно 32 миллиона лет назад), которые являются в значительной мере засухоустойчивыми. Однако все исследователи сходятся во мнении, что главным внешним фактором, приведшим к дивергенции и распространению Капустных, являлось изменение климата в Миоцене, что привело к возникновению открытых и более сухих мест обитания, и эта новая экологическая ниша была занята представителями нового семейства. Появление клейких семян, прилипающих к птицам и позволяющим распространение между континентами, а также самоопыление, возможно позволили ранним Капустным завоевать новые ниши (Franzke et al., 2011).

Анализ генома *A.thaliana* позволил заключить, что этот вид, как и все основные виды Капустных, прошел через три цикла полногеномных дупликаций (WGD) – γ , β , и α , за которыми следовали масштабные внутри- и межхромосомные перестройки приведшие к палеоплоидии (Hofberger et al., 2013). Наиболее важным «внутренним» фактором была α -полногеномная дупликация, произошедшая на ранних этапах истории семейства, 29-35 миллионов лет назад по разным оценкам (Simillion et al., 2002; Bowers et al., 2003; Maere et al., 2005). Дупликации генома способствовали адаптивной радиации, экогеографической диверсификации и видообразованию. Эта дупликация послужила источником генетического материала для возникновения новых генов и позволила семейству относительно быстро приспособиться к изменившемуся климату (Couvreur et al., 2010). Темпы диверсификации Капустных являются одними из самых высоких среди цветковых растений (Franzke et al., 2011).

Проведенный филогенетический анализ позволил заключить, что ген *ICE2* является специфичным для семейства Капустные. Белок-кодирующие гены, которые не имеют ортологов за пределами вида или более крупного таксона, получили название Lineage-specific genes (LSGs). Знание о механизмах возникновения таких таксон-специфичных генов поможет установить, каковы механизмы их возникновения и сохранения в геномах, а также развития адаптаций тех или иных таксонов. Donoghue и др. изучили более 1700 LSG Капустных в геноме *A.thaliana* (Donoghue et al., 2011). Было установлено, что такие гены имеют высокую тканеспецифичность и, как правило,

обладают низким уровнем экспрессии в различных тканях и на всех уровнях развития. Кроме того, значительную долю составили гены абиотического стрессового ответа, следовательно, эти гены оказались важны для адаптаций (Donoghue et al., 2011). Также было установлено, что около четверти LSG (417 генов) возникли в ходе дупликации. Lin и др. при исследовании 914 специфичных для Капустных генов установили, что 76% из них являются результатом сегментных дупликаций и последующей эволюции. В этих генах наблюдается повышенным числом SNP; отношение числа несинонимичных к числу синонимичных замен выше, чем у неспецифичных генов, что говорит о повышенных темпах эволюции аминокислотной последовательности. (Lin et al., 2010).

Мы предполагаем, что дупликация гена *ICE*, произошедшая у Капустных, может быть связана с дивергенцией родов и видов. Таксоны, приобретшие генетические преимущества, обеспечивающие устойчивость к низким температурам, смогли занять новые экологические ниши, появившиеся в ходе похолодания. Эти генетические преимущества возникли в ходе адаптивной эволюции дублированных генов. Большинство дублированных генов оказываются утеряны в ходе эволюции. Их сохранению в геноме способствуют приобретение ими новых функций в ходе суб- или неофункционализации (Rensing, 2014). Возможно, появление нового транскрипционного фактора *ICE2*, а значит, и дополнительных механизмов регуляции холодового ответа, послужило дополнительным фактором, способствовавшим широкому распространению и активному видообразованию Капустных.

4.4. Внутривидовой полиморфизм и межвидовая дивергенция последовательностей генов *ICE1* и *ICE2*

Ген *ICE2* характеризуется наличием большего числа гаплотипов и повышенным нуклеотидным разнообразием по сравнению с *ICE1* (табл. 9). Согласно проведенному филогенетическому анализу, полиморфизм последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* *A. thaliana* обусловлен в значительной степени давлением отбора, а не родственными связями между расами вследствие их географического ареала (рис. 14).

Значения соотношения числа несинонимичных замен к синонимичным ($\omega = K_a/K_s$) для обоих генов ниже 1, что говорит о давлении стабилизирующего отбора. Однако для пары ортологов *ICE2* из *A. thaliana* и *A. lyrata* на порядок выше, чем ω для пары ортологов *ICE1* (табл. 12). Следовательно, последовательность гена *ICE2*

эволюционировала под более слабым давлением отбора, чем *ICE1*. Примененные нами тесты на нейтральность и гетерогенность молекулярной эволюции (тест МакДональда-Крейтмана, индекс нейтральности, теста Макдональда на гетерогенность) показали, что эволюция *ICE1* происходила под давлением стабилизирующего отбора, что согласуется с данными по распределению несинонимичных и синонимичных замен по гену. Это давление действовало гомогенно на последовательность, согласно тесту МакДональда. Уровень несинонимичного нуклеотидного полиморфизма по гену *ICE1* примерно в два раза выше синонимичного полиморфизма по *ICE1* и несинонимичного по гену *ICE2* (табл. 10, 11).

Клиальной изменчивости по уровню полиморфизма *ICE1* не обнаружено. Эти данные говорят о том, что ген *ICE1* имеет более древнее происхождение, чем *ICE2*, что и подтвердилось в ходе филогенетического анализа макроэволюции, показавшего, что гомологи гена *ICE2* существуют только у видов семейства Капустные. Уровень несинонимичного полиморфизма по гену *ICE2* выше в южных расах *A. thaliana* по сравнению с северными, однако он ниже уровня синонимичного полиморфизма в той же группе южных рас (табл. 11). Из этого следует, что пониженное давление отбора на ген *ICE2* происходило в недавнем эволюционном прошлом вида. Механизмы акклиматизации и развития устойчивости к холоду требуют большого напряжения физиологии и биохимии растительной клетки, так как они требуют изменений в экспрессии генов, синтеза белков и метаболитов (Климов, 2001; Войников, 2013; Hannah et al., 2006). В южной области ареала вида, где растения, как правило, не испытывают гипотермии, мутации, негативно влияющие на холодовой ответ, будут не летальными, а возможно полезными, так как ингибирование пути холодowego ответа позволяет более эффективно использовать энергетические и метаболические ресурсы, в норме затрачиваемые на поддержание системы ответа на холод.

Регионом происхождения *A. thaliana* считается Кавказ (Beck et al., 2008), а естественный ареал обитания включает Европу и Центральную Азию (Koornneef et al., 2004). Следовательно, паттерн распространения вида, наблюдаемый в настоящее время и включающий субтропические регионы, является результатом последующей миграции (Beck et al., 2008). Высокий уровень полиморфизма по гену *ICE2*, наблюдаемый в расах из южной и умеренной зоны по сравнению с северными (табл. 9, 11), говорит о том, что стабилизирующий отбор ослаблен в регионах с более теплым климатом, где признак

устойчивости к холоду не является необходимым для выживания. Наши данные позволяют предположить, что в ходе миграции вида в более теплые зоны пониженное давление стабилизирующего отбора на «молодой» в эволюционном отношении ген *ICE2* привело к накоплению и закреплению в популяциях многочисленных мутаций. Эти мутации привели к нарушению работы гена и внесли вклад в пониженную устойчивость к холоду южных рас по сравнению с северными, то есть в клинальную изменчивость по устойчивости к холоду, на существование которой указывают многочисленные исследования (Hannah et al., 2006, Zhen and Ungerer, 2008; Zuther et al., 2012).

Клинаяльная изменчивость по уровню полиморфизма *ICE2* подтверждает предположение о роли гена в устойчивости к холоду (Fursova et al., 2009). Отсутствие подобной изменчивости по гену *ICE1* является неожиданным результатом, так как ген является известным регулятором ответа на гипотермию (Chinnusamy et al., 2003). Повышенное давление стабилизирующего отбора на *ICE1* может быть вызвано его важной ролью также в других важных процессах, таких как развитие устьиц (Kanaoka et al., 2008) и регуляции роста растения, опосредованной генами *CBF* (Achard et al., 2008).

Усредненное по всей последовательности значение K_a/K_s может не отражать действия отбора на определенные участки гена. Последовательность *ICE2* в целом эволюционировал по модели, близкой к нейтральной, однако выявлена гетерогенность в распределении полиморфизма к дивергенции. Значения K_a/K_s больше 1, указывающие на действие стабилизирующего отбора, были выявлены при анализе методом движущегося окна. Они располагаются в АСТ-подобном домене, участвующим в димеризации и других белок-белковых взаимодействиях ТФ семейства bHLH, и специфичных для *ICE2* лейцин-богатом домене и области из 19 отрицательно заряженных аминокислот (рис. 16). Однако по результатам теста Таджимы и анализа распределения полиморфизма к дивергенции по гену *ICE2* на АСТ-подобный домен действовал балансирующий отбор. Анализ распределения полиморфизма к дивергенции и тест Таджимы также указывают на действие стабилизирующего отбора на область домена bHLH и 3' и 5'-НТР генов *ICE*, а балансирующего - на ZIP домен и переменную часть 1 экзона в районе 953-го нуклеотида, не относящуюся к известным доменам (Приложение, рис. 4). 5'-НТР может являться важным для регуляции экспрессии гена, а bHLH необходим для связывания белка с ДНК (Chinnusamy et al.,

2003). Структурная дивергенция генов *ICE* возможно явилась основой функциональной дивергенции белков ICE.

Повышенное значение π_a/π_s в некоторых областях гена *ICE1* могло указывать на наличие следов движущего отбора, однако общий низкий уровень полиморфизма по этому гену позволяет предположить, что наблюдаемые значения случайны и незначимы. Повышенное значение π_a/π_s было зафиксировано только в Южной группе рас в домене NLS (Приложение, рис. 3). Несинонимичный полиморфизм локализуется практически полностью в первом экзоне гена *ICE2*, в то время как он распределен равномерно по гену *ICE1* (рис. 15). Первый экзон *ICE2* является наиболее полиморфным на внутри- и межвидовом уровне, а наиболее консервативным является 5'-НТР и домен bHLH.

Таким образом, последовательность гена *ICE1*, по-видимому, испытывала действие стабилизирующего отбора. Последовательность гена *ICE2* эволюционировала по гетерогенному сценарию. Во-первых, выявлено ослабленное действие стабилизирующего отбора, особенно в Южных расах, что выразилось в клинальной изменчивости по уровню нуклеотидного полиморфизма. Выявлены следы действия движущего отбора (в некоторых областях гена в Южных расах), балансирующего отбора (ACT-подобный, ZIP домен, переменная часть 1 экзона), стабилизирующего отбора (5'-НТР, домен bHLH). Что интересно, стабилизирующий отбор действовал на важнейший ДНК-связывающий и/или димеризационный домен (bHLH), а балансирующий – на дополнительные димеризационные домены (ACT-подобный, ZIP). Известно, что фиксация по крайней мере некоторых дублированных копий генов *A.thaliana* происходит под влиянием движущего отбора, согласно гипотезе неофункционализации (Moore and Purugganan, 2003). В то же время, данные по другим генам показывают, что главную роль в этом процессе играет ослабление стабилизирующего отбора, согласно гипотезе субфункционализации (Lynch and Force, 2000). Наши данные говорят о том, что обе эти модели действуют в случае с геном *ICE2* и согласуются с гипотезой суб-нео-функционализации, выдвинутой He and Zhang (2005).

Проведенные нами исследования расширяют представления о молекулярной эволюции и нуклеотидном разнообразии генов-регуляторов холодового ответа и, следовательно, служат лучшему пониманию механизмов адаптации видов к климату. До настоящего времени подобный анализ эволюции и полиморфизма проводился только для генов семейства *CBF* (McKhann et al., 2008, Zhen and Ungerer, 2008). Мы показали,

что различные участки гомологичных генов *ICE* испытывали различное давление отбора в ходе эволюции.

4.5. Возможная модель эволюции генов *ICE*

Процесс возникновения и фиксации в геноме дублированных генов является одним из центральных вопросов молекулярной эволюции. Дупликация генов возникает в результате удвоения всего генома (whole-genome duplication, WGD), сегментных дупликаций (включая тандемные дупликации) или посредством транспозиции (Rensing, 2014). Показано, что гены, появившиеся в результате сегментной дупликации, эволюционируют более быстрыми темпами после дупликации и сильнее дивергируют функционально, по сравнению с генами, появившимися после полногеномной дупликации (Carretero-Paulet and Fares, 2012). Это связывают с гипотезой дозового баланса, согласно которой сохранение в геноме сегментного дубликанта является невыгодным вследствие возникновения стехиометрического дисбаланса, и только быстрая дивергенция и приобретение геном новых функций может позволить обоим паралогам сохраниться в геноме (Freeling and Thomas, 2006).

Популяционная генетика предсказывает, что дополнительная копия гена не может поддерживаться в геноме в течение длительного времени, так как накопление «вредных» мутаций приведет к дефункционализации гена. Таким образом, необходимым условием сохранения дублированной версии гена является функциональная дивергенция предкового и нового гена. Гипотеза неофункционализации (NF) предполагает, что после дупликации одна дочерняя копия сохраняет предковые функции, в то время как другая приобретает новые (Ohno, 1970). Эта гипотеза была в дальнейшем расширена: ген, приобретающий новые функции, может сохранить все (NF-I), ни одной (NF-II) или некоторые (NF-III) функции предкового гена (He and Zhang, 2005; рис. 27). Гипотеза субфункционализации (SF) предполагает, что после дупликации происходит накопление вредных мутаций в обоих дубликантах, и, таким образом, функции предкового гена оказываются распределены между дочерними (Hughes, 1994; Force et al., 1999). Эта гипотеза была развита в математическую модель, описывающую процесс субфункционализации, - модель «дупликации – дегенерации – комплементации» (“duplication – degeneration – complementation”, DDC) (Lynch and Force, 2000). Эта модель постулирует, что после

дубликации обе копии гена сохраняются в геноме в связи с возникновением в них комплементарных дегенеративных мутаций. В ходе этого процесса функции предкового гена распределяются между дочерними копиями из-за возникновения в них нейтральных мутаций (Force et al., 1999). Эти модели соответствуют теории нейтральности молекулярной эволюции, разработанной Мото Кимурой в конце 1960-х годов и предполагают, что LSG скорее являются результатом пассивной фиксации дубликанта, чем следствием позитивной адаптации к условиям окружающей среды (Кимура, 1985). Ряд экспериментальных работ подтверждает эту модель (Duarte et al., 2006; Wang et al., 2013).

Однако появилось множество эмпирических доказательств и теоретических работ, демонстрирующих, что эволюция дублицированных генов идет под действием движущего отбора, приводящего к неофункционализации (NF) (Wang et al., 2013). Впервые роль движущего отбора в эволюции дублицированных генов была предложена еще в работе Hughes, в модели субфункционализации (Hughes, 1994), однако лишь в 2007 году была сформулирована модель «избегания адаптационного конфликта» ("Escape from Adaptive Conflict", EAC), согласно которой эволюционный процесс образования нового гена начинается еще до дубликации нуклеотидной последовательности (Hittinger and Carroll, 2007). Адаптивный конфликт между старой и формирующейся новой функцией одного гена возникает вследствие невозможности осуществления этих функций одновременно с максимальной эффективностью. После дубликации происходит специализация выполняемых функций или характера экспрессии в различных тканях или на разных стадиях развития. Конечный результат оказывается таким же, как и в модели DDC, то есть фиксация дубликанта, однако согласно EAC, на паралоги действует движущий отбор, приводя к фиксации адаптивных мутаций, а не простое накопление нейтральных мутаций (Wang et al., 2013).

Однако ни NF, ни SF поодиночке не могут в полной мере объяснить механизм возникновения функциональной дивергенции большинства дублицированных генов. Модель субнеофункционализации (SNF) предполагает, что после дубликации происходит быстрая SF с последующим долгим периодом NF (He and Zhang, 2005). Таким образом, закрепление дублицированной копии в геноме происходит благодаря быстрой SF, что согласуется с высокой скоростью накопления вредных мутаций после дубликации по сравнению с полезными (Lynch and Force, 2000). Данная модель также

согласуется с данными о повышенной скорости эволюции последовательности гена после дупликации (Lynch and Conery, 2000; Kondrashov et al., 2002). Более быстрая эволюция гена может объясняться ослаблением стабилизирующего отбора или действием движущего отбора (He and Zhang, 2005). Описаны случаи, когда главной эволюционной силой, действующей на паралоги, был движущий отбор (Zhang, 2003), однако, как правило, только небольшая доля сайтов в гене испытывает на себе давление такого отбора (Hughes, 2002). Согласно модели SNF, на первом этапе вскоре после дупликации главным механизмом, обеспечивающим функциональную дивергенцию, является ослабление стабилизирующего отбора, а движущий отбор действует в более длительной перспективе (He and Zhang, 2005). Wang et al., 2013, изучив 137 *A.thaliana*-специфичных генов, установили, что около 15% новых дубликантов *A.thaliana* испытывают давление позитивного отбора. Следовательно, значительная доля новых генов появляются и эволюционируют согласно модели ЕАС.

Согласно нашим данным, дупликация, приведшая к формированию *ICE2*, является относительно молодой – по данным He and Zhang, гены, появившиеся до 25 Ма, испытывают главным образом ослабление стабилизирующего отбора, приводящее к SF, а NF развивается на более поздних этапах эволюции (He and Zhang, 2005). Мы показали, что на ген *ICE2* действует пониженное давление стабилизирующего отбора, наиболее низкое давление действует на расы из южных и умеренных регионов. В то же время, обнаруженные нами специфичные для *ICE2* мотивы гена имели значения $K_a/K_s > 1$ при сравнении паралогов, следовательно, движущий отбор сыграл важную роль в эволюции новых доменов белка. Известно, что движущий отбор является одной из главных механизмов возникновения новых структур и функций белка после дупликации гена (Wang et al., 2005). Вероятнее всего, эволюция *ICE2* развивается по модели, близкой к SNF. Показано, что разные типы отбора могут играть роль в эволюции одного гена (Yang et al., 2006). Из наших результатов следует, что в процессе эволюции *ICE2* на разные участки гена действует отбор разного типа - движущий, стабилизирующий и балансирующий.

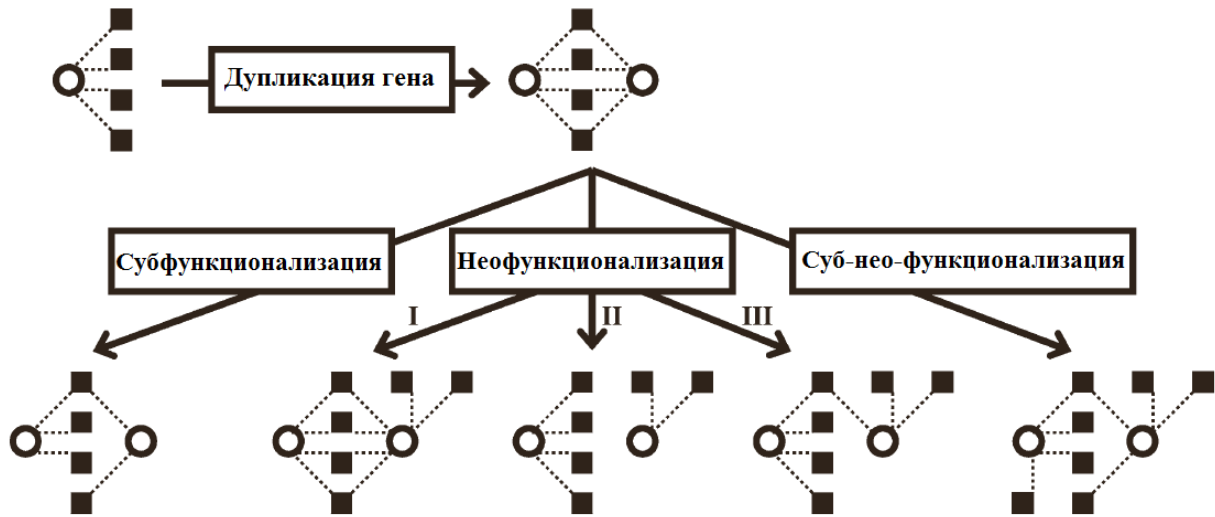


Рис. 27. Эволюционные модели функциональной дивергенции дублицированных генов. Дублицированные гены обозначены окружностями, различные функции генов – темными квадратами. Пунктиром связаны гены с их функциями (адаптировано из He and Zhang, 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение роли гена *ICE2* на организменном уровне позволило подтвердить в нашей работе его роль в холодовом ответе (Fursova et al., 2009) и развитии устьиц (Канаока 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 ТФ 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. К сожалению, суперэкспрессия многих ТФ приводит к непредсказуемым и даже неблагоприятным для растения последствиям. Следовательно, знания о специфичных факторах, действующих в определенной ткани или органе, могут быть полезны для направленной защиты от стресса, и *ICE2* может быть использован для решения подобного рода задач. Мы также предполагаем, что в дальнейшем будут обнаружены и другие гены и системы, отвечающие за устойчивость к холоду различных тканей и органов растения. Это может привести к возникновению новой области исследований генетики абиотического стрессового ответа.

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 перехода растений *A. thaliana* на репродуктивную стадию развития 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 видов ранних Капустных. На основании анализа внутривидового

полиморфизма и межвидовой дивергенции генов *ICE1* и *ICE2* было установлено, что на ген *ICE1* действовал стабилизирующий отбор, что отразилось как в низком уровне полиморфизма, так и в 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 и специализации функций предкового гена, т.е. ее разделению между дочерними копиями. Подобная схема согласуется с гипотезой субнеофункционализации (рис. 27). Кроме того, различное давление отбора на ген *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. Что интересно, недавно было показано, что *ICE1* участвует в распаде эндосперма при развитии зародыша (Denay et al., 2014). Таким образом, мы предполагаем, что именно *ICE2* может играть более важную роль в регуляции холодного ответа.

Изменения в структуре промотора, кодирующей области гена и возможная коэволюция дополнительных факторов вместе привели к возникновению новых функций *ICE2* на организменном уровне (рис. 28), 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.

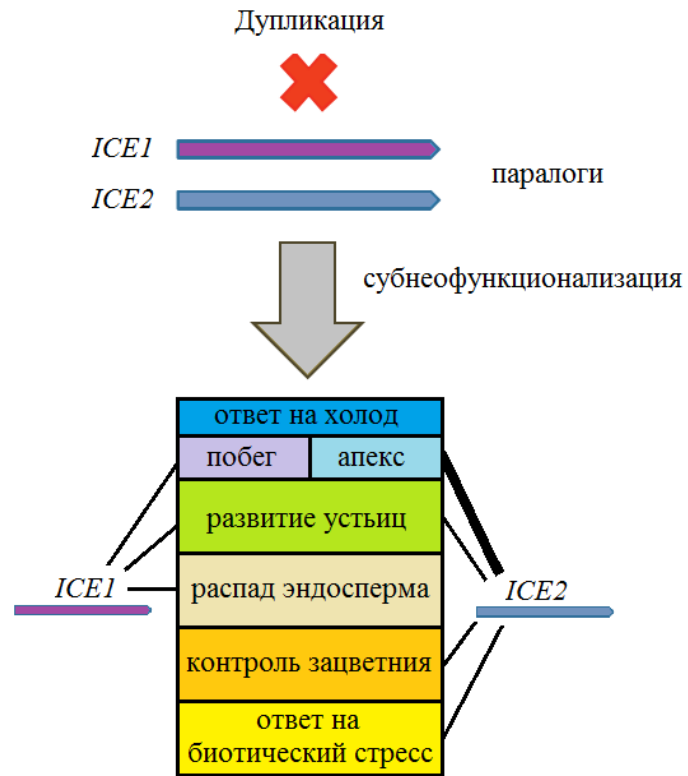


Рис. 28. Предполагаемая модель эволюции генов *ICE* и выполняемые ими функции.

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 СОКРАЩЕНИЙ

bHLH – basic helix-loop-helix

bZIP – basic leucine zipper

CBF – CRT-binding factor

CRT – C-repeat

DAG - диацилглицерин

InDel (insertion/deletion) – инсерция/делеция

IP₃ – инозитолтрифосфат

NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Национальный центр биотехнологической информации США

NLS – nuclear localization signal

PIP₂ – фосфатидилинозитол

PLC – фосфолипаза C

QTL (quantitative trait locus) – локус количественного признака

SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

TBE – трис-боратный буфер

Tris – (tris(hydroxymethyl)aminomethane) трис(гидроксиметил)аминометан
а.о. – аминокислотный остаток

АБК – абсцизовая кислота

БД – база данных

ДТ – дикий тип

Ма – миллионов лет назад

н.у. – нормальные условия

НК – нуклеиновая кислота

НТР – нетранслируемый регион

п.н. – пары нуклеотидов

ПМ – плазматическая мембрана

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

РФК – реактивные формы кислорода

ТФ – транскрипционный фактор

ЦТАБ - цетилтриметиламмоний бромид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аванов А.Я. Биологические антифризы и механизм их активности // Молекулярная биология. 1990. Т. 24. №3. С. 581-597.
2. Войников В.К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии. Новосибирск: Наука. 2013. 211 с.
3. Квитко К.В. Асептическая культура *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунһ. и перспективы ее использования в ботанических исследованиях // Вестник Ленинградского университета, серия биол. 1960. Т. 3. С. 47-56.
4. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. Пер. с англ. М.: Мир. 1985. 394 с.
5. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. // Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163-178.
6. Кузнецов В.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 5. С. 658-683.
7. Курбидаева А.С., Зарецкая М.В., Солтабаева А.Д., Новокрещёнова М.Г., Куприянова Е.В., Федоренко О.М., Ежова Т.А. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* к экстремальным условиям северной границы ареала // Генетика. 2013. Т. 49, №18. С. 943-952.
8. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир. 2014. 372 с.
9. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений, 2005. Т. 52. №1. С. 1-24.
10. Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Создание молекулярных маркеров на гены DREB пырейного происхождения, обеспечивающих повышение засухоустойчивости в геномах злаков // Вестник Башкирского университета, 2013. Т. 18. № 3. С. 745-747.
11. Федоренко О.М., Грицких М.В., Николаевская Т.С. Полиморфизм по времени начала цветения у *Arabidopsis thaliana* (L) Неунһ. на северной границе его ареала // Труды КарНЦ РАН. 2012. Т. 2. С. 139-146.
12. Федоренко О.М., Савушкин А.И., Олимпиенко Г.С. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунһ. в Карелии // Генетика. 2001. Т. 37.

№ 2. С. 223–229.

13. Янушкевич С.И. Использование арабидопсис в практических занятиях по общей генетике. М.: Изд. МГУ. 1985. 62 с.
14. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling // *Plant Cell*. 2003. V. 15(1). P. 63-78.
15. Achard P., Gong F., Cheminant S., Alioua M., Hedden P., Genschik P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 2117–2129.
16. Agarwal M., Hao Y., Kapoor A., Dong C.H., Fujii H., Zheng X., Zhu J.K. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance // *J Biol Chem*. 2006. V. 281(49). P. 37636-37645.
17. Agren J., Schemske D.W. Reciprocal transplants demonstrate strong adaptive differentiation of the model organism *Arabidopsis thaliana* in its native range // *New Phytol*. 2012. V. 194. P. 1112-1122.
18. Akey J.M., Zhang G., Zhang K., Jin L., Shriver M.D. Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection // *Genome Res*. 2002. V. 12. P.1805–1814.
19. Alonso-Blanco C., Aarts M.G., Bentsink L., Keurentjes J.J., Reymond M., Vreugdenhil D., Koornneef M. What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 1877-1896.
20. Alonso-Blanco C., Gomez-Mena C., Llorente F, Koornneef M., Salinas J., Martínez-Zapater J.M. Genetic and molecular analyses of natural variation indicate *CBF2* as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2005. V. 139(3). P.1304-12.
21. Alonso-Blanco C., Koornneef M. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics // *Trends Plant Sci*. 2000. V. 5. P. 22–29.
22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol*. 1990. V. 215. P. 403-410.
23. Anthony-Cahill J., Benfield P.A., Fairman R. et al. Molecular characterization of helix loop helix peptides // *Science*. 1992. V. 255. P. 979–983.

24. Aro E.M., Virgin I., Andersson B. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover // *Biochim Biophys Acta*. 1993. V. 1143. P. 113–134.
25. Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C., Thomashow M.F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. V. 93. P. 13404–13409.
26. Atwell S., Huang Y.S., Vilhjalmsson B.J., Willems G., Horton M., Li Y., Meng D., Platt A., Tarone A.M., Hu T.T., Jiang R., Mulyati N.W., Zhang X., Amer M.A., Baxter I., Brachi B., Chory J., Dean C., Debieu M., de Meaux J., Ecker J.R., Faure N., Kniskern J.M., Jones J.D., Michael T., Nemri A., Roux F., Salt D.E., Tang C., Todesco M., Traw M.B., Weigel D., Marjoram P., Borevitz J.O., Bergelson J., Nordborg M. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines // *Nature*. 2010. V. 465. P. 627–631.
27. Baron K.N., Schroeder D.F., Stasolla C. Transcriptional response of abscisic acid (ABA) metabolism and transport to cold and heat stress applied at the reproductive stage of development in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci*. 2012. V. 188–189. P. 48–59.
28. Barrero J.M., Rodríguez P.L., Quesada V., Piqueras P., Ponce M.R., Micol J.L. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABA1* in response to salt stress // *Plant Cell Environ*. 2006. V. 29: P. 2000–2008.
29. Barrier M., Bustamante C.D., Yu J., Purugganan M.D. Selection on rapidly evolving proteins in the *Arabidopsis* genome // *Genetics*. 2003. V. 163(2). P. 723–733.
30. Baxevanis A.D., Vinson C.R. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? // *Curr Opin Genet Dev*. 1993. V. 3(2). P. 278–285.
31. Beck J.B., Schmuths H., Schaal B. A. Native range genetic variation in *Arabidopsis thaliana* is strongly geographically structured and reflects Pleistocene glacial dynamics // *Mol Ecol*. 2008. V. 17(3). P. 902–915.
32. Benedict C., Geisler M., Trygg J., Huner N., Hurry V. Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2006. V. 141(4). P. 219–232.
33. Bergelson J., Roux F. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana* // *Nat Rev Genet*. 2010. V. 11. P. 867–879.

34. Bowers J.E., Chapman B.A., Rong J., Paterson A.H. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events // *Nature*. 2003. V. 422. P. 433–438.
35. Breton G., Danyluk J., Charron J. B., Sarhan, F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2003. V. 132. P. 64–74.
36. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone // *Annu Rev Plant Biol*. 2009. V. 60. P. 183-205.
37. Carretero-Paulet L., Fares M.A. Evolutionary dynamics and functional specialization of plant paralogs formed by whole and small-scale genome duplications // *Mol Biol Evol*. 2012. V. 29(11). P. 3541-3551.
38. Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B. H., Hong X., Agarwal M., Zhu J. K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* // *Genes Dev*. 2003. V. 17(8). P. 1043-1054.
39. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants // *Trends Plant Sci*. 2007. V. 12 P. 444–451.
40. Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors // *J Biol Chem*. 2000. V. 275(3). P. 1723-1730.
41. Choi K., Kim J., Hwang H.J., Kim S., Park C., Kim S.Y., Lee I. The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors // *The Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 289–303.
42. Clausen J., Keck D.D., Hiesey W.M. Regional differentiation in plant species // *Am Nat*. 1941. V. 75. P. 231-250.
43. Close T. J. (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // *Physiologia Plantarum*. 1997. V. 100. P. 291–296.
44. Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis* // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. V. 101. P. 15243–15248.
45. Couvreur T.L., Franzke A., Al-Shehbaz I.A., Bakker F.T., Koch M.A., Mummenhoff K. Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae) // *Mol Biol Evol*. 2010. V. 27(1). P. 55-71.

46. Cutler A.J., Krochko J.E. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 472–478.
47. Czechowski T., Stitt M., Altmann T. et al. Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // *The Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 5–17.
48. de Bruxelles G. L., Peacock W. J., Dennis E. S., Dolferus R. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 1996. V. 111(2). P. 381-391.
49. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // *Plant Mol Biol Rep.* 1983. V. 1. P. 19-21.
50. Demin I.N., Shimshilashvili K.R., Yur'eva N.O., Naraykina N.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Los D.A., Nosov A.M., Trunova T.I. Overexpression of the acyl-lipid delta12-desaturase gene protects potato plants from low temperature damage // *Acta Agronomica Hungarica.* 2011. V. 59(2). P. 87–99.
51. Denay G, Creff A, Moussu S, Wagnon P, Thévenin J, Gérentes MF, Chambrier P, Dubreucq B, Ingram G. Endosperm breakdown in *Arabidopsis* requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUP1 and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1 // *Development.* 2014. V. 141(6). P. 1222-1227.
52. Depaulis F., Veuille M. Neutrality tests based on the distribution of haplotypes under an infinite-sites model // *Mol Biol Evol.* 1998. V. 15. P. 1788–1790.
53. Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J., Thomashow M.F. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance // *Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 972–984.
54. Dong C.H., Agarwal M., Zhang Y., Xie Q., Zhu J.K. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. V. 103(21). P. 8281-8286.
55. Dong M.A., Farré E.M., Thomashow M.F. Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in *Arabidopsis* // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. V. 108. P. 7241–7246.
56. Donoghue M.T., Keshavaiah C., Swamidatta S.H., Spillane C. "Evolutionary origins of Brassicaceae specific genes in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Evol Biol.* 2011. V. 11. P. 47.
57. Duarte J.M., Cui L., Wall P.K., Zhang Q., Zhang X., Leebens-Mack J., Ma H., Altman N., dePamphilis C.W. Expression pattern shifts following duplication indicative of

- subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis* // *Mol Biol Evol.* 2006. V. 23(2). P. 469-478.
58. Ecological genomics and process modeling of local adaptation to climate. *Current opinion in plant biology* (Impact Factor: 10.33). 03/2014; 18C:66-72.
59. El-Assal S.E.-D., Alonso-Blanco C., Peeters A.J., Raz V., Koornneef M. A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2* // *Nat Genet.* 2001. V. 29. P. 435–440.
60. Espinoza C., Degenkolbe T., Caldana C., Zuther E., Leisse A., Willmitzer L., Hinch D.K., Hannah M.A. The interaction between diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in *Arabidopsis* // *PLoS ONE.* 2010. V. 5. P. e14101.
61. Farmer E., Almeras E., Krishnamurthy V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory // *Curr Opin Plant Biol.* 2003. V. 6(4). P. 372-378.
62. Fay J.C., Wu C.I. Hitchhiking under positive Darwinian selection // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 1405–1413.
63. Feller A, Hernandez JM, Grotewold E. An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2006;281:28964–28974.
64. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783-791.
65. Flagel L E., Wendel J.F. Gene duplication and evolutionary novelty in plants // *New Phytol.* 2009. V. 183(3). P. 557-564.
66. Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y.L., Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // *Genetics.* 1999. V. 151(4). P. 1531-1545.
67. Fournier-Level A., Korte A, Cooper M.D., Nordborg M., Schmitt J., Wilczek A.M. A map of local adaptation in *Arabidopsis thaliana* // *Science.* 2011. V. 334. P. 86-89.
68. Fowler S., Thomashow M.F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 1675–1690.
69. François O., Blum M.G., Jakobsson M., Rosenberg N.A. Demographic history of european populations of *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Genet* 2008. V. 4. P. e1000075.

70. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures. Cambridge: Cambridge University Press. 1985. 222 p.
71. Franzke A., Lysak M.A., Al-Shehbaz I.A., Koch M.A., Mummenhoff K. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae // Trends Plant Sci. 2011. V. 16(2). P. 108-116.
72. Freeling M., Thomas B.C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity // Genome Res. 2006. V. 16. P. 805–814.
73. Fu Y.X., Li W.H. Statistical tests of neutrality of mutations // Genetics. 1993. V. 133. P. 693–709.
74. Fursova O.V., Pogorelko G.V., Tarasov V.A. Identification of *ICE2*, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Gene. 2009. V. 429. P. 98–103.
75. Gan X., Stegle O., Behr J., Steffen J.G., Drewe P., Hildebrand K.L., Lyngsoe R., Schultheiss S.J., Osborne E.J., Sreedharan V.T., Kahles A., Bohnert R., Jean G., Derwent P., Kersey P., Belfield E.J., Harberd N.P., Kemen E., Toomajian C., Kover P.X., Clark R.M., Ratsch G., Mott R. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2011. V. 477. P. 419–423.
76. Gery C., Zuther E., Schulz E., Legoupi J., Chauveau A, McKhann H., Hinch D.K., Téoulé E. Natural variation in the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*: effects of RNAi-induced CBF depletion and QTL localisation vary among accessions // Plant Sci. 2011. V. 180(1). P. 12-23.
77. Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities // Plant Mol. Biol. 2004. V. 54. P. 767–781.
78. Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities // Plant Mol Biol. 2004. V. 54(5). P. 767-781.
79. Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D., Thomashow M.F. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple

biochemical changes associated with cold acclimation // *Plant Physiol.* 2000. V. 124(4). P. 1854–1865.

80. Goryunova S.V., Salentijn E.M., Chikida N.N., Kochieva E.Z., van der Meer I.M., Gilissen L.J., Smulders M.J. Expansion of the gamma-gliadin gene family in *Aegilops* and *Triticum* // *BMC Evol Biol.* 2012. V. 12. P. 215.

81. Grandori C., Cowley S.M., James L.P., Eisenman, R.N. The MYC/MAX/MAD network and the transcriptional control of cell behavior // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2000. V. 16. P. 653–699.

82. Gray G.R., Heath D. A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolic fingerprinting // *Physiol. Plant.* 2005. V. 124. P. 236–248.

83. Guo WJ, Li P, Ling J, Ye SP. Significant comparative characteristics between Orphan and Nonorphan Genes in the Rice (*Oryza sativa* L.) Genome // *Comp Funct Genomics.* 2007. V. 2007. P. 21676.

84. Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1990. V. 41. P. 187–223.

85. Haberer G, Hindemitt T, Meyers B.C., Mayer K.F. Transcriptional similarities, dissimilarities, and conservation of cis-elements in duplicated genes of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. V. 136(2). P. 3009-3022.

86. Hancock A.M., Brachi B., Faure N., Horton M.W., Jarymowycz L.B., Sperone F.G., Toomajian C., Roux F., Bergelson J. Adaptation to climate across the *Arabidopsis thaliana* genome // *Science.* 2011. V. 334 P. 83-86.

87. Hannah M.A., Wiese D., Freund S., Fiehn O., Heyer A.G., Hinch D.K. Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 142 P. 98–112.

88. He X., Zhang J. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution // *Genetics.* 2005. V. 169(2). P. 1157-1164.

89. Helliwell C.A., Wood C.C., Robertson M. James Peacock W., Dennis E.S. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high molecular weight protein complex // *The Plant J.* 2006. V. 46. P. 183–192.

90. Hemsley P.A., Hurst C.H., Kaliyadasa E., Lamb R., Knight M.R., De Cothi E.A., Steele J.F., Knight H. The Arabidopsis mediator complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate mediator and RNA polymerase II recruitment to CBF-responsive cold-regulated genes // *Plant Cell*. 2014. V. 26(1). P. 465-484.
91. Heo J.B., Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA // *Science*. 2011. V. 331(6013). P. 76–79.
92. Hetherington A.M. Guard cell signaling // *Cell*. 2001. V. 107. P. 711-714.
93. Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 297-300.
94. Hiratsu K., Ohta M., Matsui K., Ohme-Takagi M. The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxyterminal repression domain is required for the development of normal flowers. 2002. *FEBS Lett.* V. 514. P. 351–354.
95. Hittinger, C.T., Carroll S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch // *Nature*. 2007. V. 449(7163). P. 677-681.
96. Hofberger J.A., Lyons E., Edger P.P. Pires J.C., Schranz M.E. Whole genome and tandem duplicate retention facilitated glucosinolate pathway diversification in the mustard family // *Gen Biol Evol.* 2013. V. 5. P. 2155-2173.
97. Hoffmann M.H. Evolution of the realized climatic niche in the genus: *Arabidopsis* (Brassicaceae) // *Evolution*. 2005. V. 59. P. 1425-1436.
98. Horton M.W., Hancock A.M., Huang Y.S., Toomajian C., Atwell S., Auton A., Mulyati N.W., Platt A., Sperone F.G., Vilhjálmsson B.J., Nordborg M., Borevitz J.O., Bergelson J. Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. P. 212–216.
99. Hsieh T.H., Lee J.T., Charng Y.Y., Chan M.T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* 2002. V. 130(2). P. 618–626.
100. Hu Y., Jiang L., Wang F., Yu D. Jasmonate regulates the inducer of *cbf* expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2013. V. 25(8). P. 2907-2924.
101. Hua J. From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variation in plants // *Curr Opin Plant Biol.* 2009. V. 12. P. 568–573.

102. Hudson R.R., Bailey K., Skarecky D., Kwiatowski J., Ayala F.J. Evidence for positive selection in the superoxide-dismutase (Sod) region of *Drosophila-melanogaster* // *Genetics*. 1994. V. 136. P. 1329–1340
103. Hudson R.R., Bailey K., Skarecky D., Kwiatowski J., Ayala F.J. Evidence for positive selection in the superoxide-dismutase (Sod) region of *Drosophila-melanogaster* // *Genetics*. 1994. V. 136. P. 1329–1340.
104. Hudson R.R., Kreitman M., Aguade M. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data // *Genetics*. V. 1987. 116. P. 153–159.
105. Hughes A. L. Adaptive evolution after gene duplication // *Trends Genet*. 2002. V. 18(9). P. 433-434.
106. Hughes A.L. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication // *Proc Biol Sci*. 1994. V. 256(1346). P. 119-124.
107. Hughes A.L., Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class-I loci reveals overdominant selection // *Nature*. 1988. V. 335. P. 167–170.
108. Hurst L.D. The K_a/K_s ratio: diagnosing the form of sequence evolution // *Trends Genet*. 2002. V. 18(9). P. 486.
109. Immink R.G., Pose D., Ferrario S., Ott F., Kaufmann K., Valentim F.L., de Folter S., van der Wal F., van Dijk A.D., Schmid M. Angenent G.C. Characterization of SOC1's central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators // *Plant Physiol*. 2012. V. 160(1). P. 433-449.
110. Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of rice DREB1/CBF type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice // *Plant Cell Physiol*. 2006. V. 47(1). P. 141–153.
111. Jackson M.W., Stinchcombe J.R., Korves T.M., Schmitt J. Costs and benefits of cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* // *Mol Ecol*. 2004. V. 13. P. 3609–3615.
112. Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G. Schabenberger O., Thomashow M.F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance // *Science*. 1998. V. 280(5360). P. 104–106.
113. Jarillo J. A., Leyva A., Salinas J., Martinez-Zapater J.M. Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant // *Plant Physiol*. 1993. V. 101(3). P. 833-837.

114. Jorgensen S, Mauricio R. Neutral genetic variation among wild North American populations of the weedy plant *Arabidopsis thaliana* is not geographically structured // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. P. 3403–3413.
115. Kamata T., Uemura M. Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance // *Cryo Letters.* 2004. V. 25. P. 311–322.
116. Kanaoka M.M., Pillitteri L.J., Fujii H., Yoshida Y., Bogenschutz N.L., Takabayashi J., Zhu J.K., Torii K.U. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation // *Plant Cell.* 2008. V. 20(7). P. 1775-1785.
117. Kanehisa M. The KEGG database // *Novartis Found Symp.* 2002. V. 247. P. 91-101.
118. Kang J., Zhang H., Sun T., Shi Y., Wang J., Zhang B., Wang Z., Zhou Y., Gu H. Natural variation of C-repeat-binding factor (CBFs) genes is a major cause of divergence in freezing tolerance among a group of *Arabidopsis thaliana* populations along the Yangtze River in China // *New Phytol.* 2013. V. 199(4). P.1069-1080.
119. Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C., Gatzke N., Sung D.Y., Guy C.L. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 4159–4168.
120. Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp M., Porat R., Guy C.L. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content // *Plant J.* 2007. V. 50. P. 967–981.
121. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor // *Nat Biotechnol.* 1999. V. 17(3). P. 287–291.
122. Kawamura Y., Uemura M. Chapter 5 – Plant low-temperature tolerance and its cellular mechanisms. In: Jenks M.A., Hasegawa P.M., eds. *Plant Abiotic Stress, Second Edition.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2014. P. 109-132.
123. Kelly J.K. A test of neutrality based on interlocus associations // *Genetics.* 1997. V. 146. P. 1197–1206.
124. Kendall S.L., Hellwege A., Marriot P., Whalley C., Graham I.A., Penfield S. Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors // *Plant Cell.* 2011 V. 23(7). P. 2568-2580.

125. Kim H.J., Hyun Y., Park J.Y., Park M.J., Park M.K., Kim M.D., Lee M.H., Moon J., Lee, I., Kim J. A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 167–171.
126. Kim H.J., Kim Y.K., Park J.Y., Kim J. Light signaling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2002. V. 29. P. 693–704.
127. Kim J.B., Kang J.Y., Kim S.Y. Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance // Plant Biotechnol J. 2004. V. 2. P. 459-466.
128. Kim Y., Nielsen R. Linkage disequilibrium as a signature of selective sweeps // Genetics. 2004. V. 167. P. 1513–1524.
129. Kim Y., Park S., Gilmour S.J., Thomashow M.F. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis* // Plant J. 2013. V. 75. P. 364–376.
130. Kim Y., Stephan W. Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome // Genetics. 2002. V. 160. P. 765–777.
131. Kishor P., Hong Z., Miao G.H., Hu C., Verma D. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants // Plant Physiol. V. 1995. V. 108. P. 1387–1394.
132. Knight H., Zarka D.G., Okamoto H., Thomashow M.F., Knight M.R. Abscisic acid induces *CBF* gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1710–1717.
133. Kondrashov F.A., Rogozin I.B., Wolf Y.I., Koonin E.V. Selection in the evolution of gene duplications // Genome Biol. 2002. V. 3(2). P. RESEARCH0008.
134. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana* // Annu Rev Plant Biol. 2004. V. 55. P. 141–172.
135. Kover P.X., Valdar W., Trakalo J., Scarcelli N., Ehrenreich I.M., Purugganan M.D., Durrant C., Mott R. A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana* // PLoS Genet. V. 2009. P. 5:e1000551.
136. Kranz A.R., Kircheim B. Genetic resources in *Arabidopsis* // AIS. 1987. V. 24. P. 249.
137. Kupriyanova E.V., Ezhova T.A., Shestakov S.V. Dimorphic DNA variation in the anionic peroxidase gene *AtPrx53* of *Arabidopsis thaliana* // Genes Genet Syst. 2007. V. 82(5).

P. 377-385.

138. Kurbidaeva A., Ezhova T., Novokreshchenova M. *Arabidopsis thaliana* ICE2 gene: Phylogeny, structural evolution and functional diversification from ICE1 // Plant Science. 2014. V. 229. P. 10-22.

139. Kuroda K., Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S. Xylem ray parenchyma cells in boreal hardwood species respond to subfreezing temperatures by deep supercooling that is accompanied by incomplete desiccation // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 736–744.

140. Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiha T., Kamiya Y., Nambara E. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism // EMBO J. 2004. V. 23(7). P. 1647-1656.

141. Kuwabara C., Wang D., Endoh K., Fukushi Y., Arakawa K., Fujikawa S. Analysis of supercooling activity of tannin-related polyphenols // Cryobiology. 2013. V. 67. P. 40–49.

142. Le Corre V., Roux F., Reboud X. DNA polymorphism at the *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time // Mol Biol Evol. 2002. V. 19. P. 1261-1271.

143. Lee B.H., Henderson D.A., Zhu J.K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. Plant Cell. 2005. V. 17(11). P. 3155-3175.

144. Lee B.H., Henderson D.A., Zhu J.K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 // Plant Cell. 2005. V. 17(11). P. 3155-3175.

145. Lee H., Guo Y., Ohta M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J.K. LOS2, a genetic locus required for coldresponsive gene transcription encodes a bifunctional enolase // EMBO J. 2002. V. 21. P. 2692–2702.

146. Lee T.H., Tang H., Wang X., Paterson A.H. PGDD: a database of gene and genome duplication in plants // Nucleic Acids Res. 2012. V. 41 P. D1152-D1158.

147. Lee Y.P., Fleming A.J., Körner Ch., Meins F.Jr. Differential expression of the CBF pathway and cell cycle-related genes in Arabidopsis accessions in response to chronic lowtemperature exposure // Plant Biol. 2009. V. 3. P. 273–283.

148. Lempe, J., Balasubramanian S., Sureshkumar S., Singh A., Schmid M., Weigel D. Diversity of flowering responses in wild *Arabidopsis thaliana* strains // PLoS Genetics. 2005. V. 1. P. e6.

149. Levy M., Bachmair A., Adam, Z. A single recessive mutation in the proteolytic machinery of Arabidopsis chloroplasts impairs photoprotection and photosynthesis upon cold stress // *Planta*. 2004. V. 218. P. 396–405.
150. Li B., Suzuki J., Hara T. Latitudinal variation in plant size and relative growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia*. 1998. V. 115. P. 293–301.
151. Lin C., Thomashow M.F. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated Arabidopsis gene *cor15* and characterization of the COR15 polypeptide // *Plant Physiol*. 1992. V. 99 P. 519–525.
152. Lin H., Moghe G., Ouyang S., Iezzoni A., Shiu S.H., Gu X., Buell C.R. Comparative analyses reveal distinct sets of lineage-specific genes within *Arabidopsis thaliana* // *BMC Evol Biol*. 2010. V. 10. P. 41.
153. Lin Y.H., Hwang S.Y., Hsu P.Y., Chiang Y.C., Huang C.L., Wang C.N., Lin T.P. Molecular population genetics and gene expression analysis of duplicated *CBF* genes of *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol*. 2008. V. 7(8). P. 111
154. Liu H., Han H., Li J., Wong L. DNAFSMiner: a web-based software toolbox to recognize two types of functional sites in DNA sequences // *Bioinformatics*. 2005. V. 21. P. 671–673.
155. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.
156. Long M., Betran E., Thornton K., Wang W. The origin of new genes: glimpses from the young and old // *Nat Rev Genet*. 2003. V. 4. P. 865-875.
157. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // *Photosynth. Res*. 2013. V. 116. P. 489-509.
158. Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing // *Nat Rev Genet*. 2003. V. 4(12). P. 981-94.
159. Lynch M., Conery J.S. The evolutionary demography of duplicate genes // *J Struct Funct Genomics*. 2003. V. 3(1-4). P. 35-44.
160. Lynch M., Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. 2000. V. 154(1). P. 459-473.
161. Lynch M., J. S. Conery. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes // *Science*. 2000. V. 290(5494). P. 1151-1155.

162. Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J., Alam, M., Ming, R., Tang, H., Wang, X., Bowers, J., Paterson, A., Lisch, D. Finding and comparing syntenic regions among Arabidopsis and the outgroups papaya, poplar and grape: CoGe with rosids // *Plant Phys.* 2008. V. 148, P. 1772–1781.
163. Maere S., De Bodt S., Raes J., Casneuf T., Van Montagu M., Kuiper M., Van de Peer Y. Modeling gene and genome duplications in eukaryotes // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. V. 102. P. 5454– 5459.
164. Magrane M., Consortium U. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data // *Database* 2011. bar009.
165. Mahajan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview // *Arch Biochem Biophys.* 2005. V. 444(2). P. 139-158.
166. Maloof, J. N., Borevitz J.O., Dabi T., Lutes J., Nehring R.B., Redfern J.L., Trainer G.T., Wilson J.M., Asami T., Berry C.C., Weigel D., Chory J. Natural variation in light sensitivity of Arabidopsis // *Nature Genet.* 2001. V. 29. P. 441–446.
167. Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito Y., Seki M., Goda H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 2004. V. 38. P. 982–993.
168. Maruyama K., Takeda M., Kidokoro S., Yamada K., Sakuma Y., Urano K., Fujita M., Yoshiwara K., Matsukura S., Morishita Y., Sasaki R., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 1972–1980.
169. McDonald J.H. Detecting non-neutral heterogeneity across a region of DNA sequence in the ratio of polymorphism to divergence // *Mol Biol Evol.* 1996. V. 13(1). P. 253-260.
170. McDonald J.H. Improved tests for heterogeneity across a region of DNA sequence in the ratio of polymorphism to divergence // *Mol Biol Evol.* 1998. V. 15(4). P. 377-384.
171. McDonald J.H., Kreitman M. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila* // *Nature.* 1991. V. 351. P. 652–654.
172. McGuffin L.J., Bryson K., Jones D.T. The PSIPRED protein structure prediction server // *Bioinformatics.* 2000. V. 16. P. 404-405.

173. McKhann H.I., Gery C., Bérard A., Lévêque S., Zuther E., Hinch D.K., De Mita S., Brunel D., Téoulé E. Natural variation in *CBF* gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2008. V. 15(8). P. 105.
174. Medina J., Bargues M., Terol J., Perez-Alonso M., Salinas J. The Arabidopsis *CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 463–470.
175. Méndez-Vigo B, Picó FX, Ramiro M, Martínez-Zapater JM, Alonso-Blanco C (2011) Altitudinal and climatic adaptation is mediated by flowering traits and FRI, FLC, and PHYC genes in Arabidopsis. Plant Physiol 157: 1942–1955
176. Michael T. P., Salomé P.A., Yu H.J., Spencer T.R., Sharp E.L., McPeck M.A., Alonso J.M., Ecker J.R., McClung C.R. Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock // Science. 2003. V. 302. P. 1049–1053.
177. Michaels S.D., Amasino R.M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 949–956.
178. Mitchell-Olds T., Schmitt J. Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis // Nature. 2006. V. 441. P. 947-952.
179. Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirm V., Miura T., Ashworth E.N., Bressan R.A., Yun D.J., Hasegawa P.M. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in Arabidopsis // Plant Cell. 2007. V. 19(4). P. 1403-1414.
180. Miura K., Ohta M., Nakazawa M., Ono M., Hasegawa P. M. ICE1 Ser403 is necessary for protein stabilization and regulation of cold signaling and tolerance // Plant J. 2011. V. 67(2). P. 269-279.
181. Montesinos-Navarro A., Wig J., Picó F.X. & Tonsor S.J. Arabidopsis thaliana populations show clinal variation in a climatic gradient associated with altitude // New Phytol. 2011. V. 189. P. 282–294.
182. Moore R.C., Purugganan M.D. The early stages of duplicate gene evolution // Proc Natl Acad Sci USA. 2003. V. 100(26). P. 15682-15687.
183. Morley RJ. 2003. Interplate dispersal paths for megathermal angiosperms. Perspect Plant Ecol Evol Syst. 6:5–20.

184. 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. V. 56(5). P. 777-783.
185. Nachman M.W. Chapter 7 – Detecting selection at the molecular level. In: Fox C.W., Wolf J.B., eds. *Evolutionary genetics, concepts and case Studies*. Oxford: Oxford Univ Press. 2006. P. 103-118.
186. Nguyen Ba A.N., Pogoutse A., Provart N., Moses A.M. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 20.
187. Nielsen R. Molecular signatures of natural selection // *Annu. Rev. Genet.* 2005. V. 39. P. 197–218.
188. Nishimura N., Yoshida T., Murayama M., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. Isolation and Characterization of Novel Mutants Affecting the Abscisic Acid Sensitivity of Arabidopsis Germination and Seedling Growth Plant // *Cell Physiol.* 2004. V. 45(10). P. 1485-1499.
189. Nordborg M., Hu T.T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., Zheng H., Bakker E., Calabrese P., Gladstone J., Goyal R., Jakobsson M., Kim S., Morozov Y., Padhukasahasram B., Plagnol V., Rosenberg N. A., Shah C., Wall J. D., Wang J., Zhao K., Kalbfleisch T., Schulz V., Kreitman M., Bergelson J. The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. P. e196.
190. Nordborg M., Hu T.T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., Zheng H., Bakker E., Calabrese P., Gladstone J., Goyal R., Jakobsson M., Kim S., Morozov Y., Padhukasahasram B., Plagnol V., Rosenberg N.A., Shah C., Wall J.D., Wang J., Zhao K., Kalbfleisch T., Schulz V., Kreitman M., Bergelson J. The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Biol.* 2005. V. 3(7). P. e196.
191. Novillo F., Medina J., Salinas J. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007. V. 104(52). P. 21002-21007.
192. Oh S.J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.J., Kim M., Kim Y.K. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth // *Plant Physiol.* 2005. V. 138(2). P. 341–351.
193. Ohno S. *Evolution by gene duplication*. Berlin, New York: Springer-Verlag. 1970.
194. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1166-1167.

195. Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // *Plant J.* 2000. V. 23(6). P. 785-794.
196. Pagni M., Ioannidis V., Cerutti L., Zahn-Zabal M., Jongeneel C.V., Hau J., Martin O., Kuznetsov D., Falquet L. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35 P. W433-437.
197. Pino M.T., Skinner J.S., Jeknić Z., Hayes P.M., Soeldner A.H., Thomashow M.F., Chen T.H., Ectopic *AtCBF1* over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. P. 393-406.
198. Purugganan M.D., Wessler S.R. Molecular evolution of the plant R regulatory gene family // *Genetics.* 1994. V. 138. P. 849–854.
199. Rensing S.A. Gene duplication as a driver of plant morphogenetic evolution // *Curr Opin Plant Biol.* 2014. V. 17. P. 43-48.
200. Richards C.L., Rosas U., Banta J., Bhambhra N., Purugganan M.D. Genome-wide patterns of Arabidopsis gene expression in nature // *PLoS Genet.* 2012. V. 8 (4). P. e1002662.
201. Richter R., Bastakis E., Schwechheimer C. Cross-repressive interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2013. V. 162(4). P. 1992-2004.
202. Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. P. 2496-2497.
203. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol Biol Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
204. Sakamoto A., Valverde R., Alia, Chen T.H., Murata N. Transformation of Arabidopsis with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants // *Plant J.* 2000. V. 22. P. 449–453.
205. Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx // *Plant J.* 2001. V. 27(1). P. 1-12.

206. Satoh R., Nakashima K., Seki M. et al. ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity- responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 709–719.
207. Savitch L.V., Barker-Astrom J., Ivanov A.G., Hurry V., Oquist G., Huner N.P., Gardeström P. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* Results in Incomplete Recovery of Photosynthetic Capacity, Associated with an Increased Reduction of the Chloroplast Stroma // *Planta.* 2001. V. 214. P. 295–303.
208. Schmid K., Törjék O., Meyer R., Schmutz H., Hoffmann M.H., Altmann T. Evidence for a large-scale population structure of *Arabidopsis thaliana* from genome-wide single nucleotide polymorphism markers // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 112. P. 1104–1114.
209. Schneeberger K., Ossowski S., Ott F., Klein J.D., Wang X., Lanz C., Smith L.M., Cao J., Fitz J., Warthmann N., Henz S.R., Huson D.H., Weigel D. Reference-guided assembly of four diverse *Arabidopsis thaliana* genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 10249–10254.
210. Scholl R.L., May S.T., Ware D.H. Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 2000. V. 124. P. 1477–1480.
211. Seo E., Lee H., Jeon J. Park H., Kim J., Noh Y.S., Lee I. Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering_time gene *SOCI* and its upstream negative regulator *FLC* // *Plant Cell.* 2009. V. 21(10). P. 3185–3197.
212. Seoighe C., Gehring C. Genome duplication led to highly selective expansion of the *Arabidopsis thaliana* proteome // *Trends Genet.* 2004. V. 20(10). P. 461-464.
213. Sheldon C.C., Finnegan E.J., Rouse D.T. The control of flowering by vernalization // *Curr Opin Plant Biol.* 2000. V. 3. P. 418–422.
214. Shimizu K.K. Ecology meets molecular genetics in *Arabidopsis*. *Popul Ecol.* 2002. V. 44. P. 221–233.
215. Shindo, C. Aranzana M.J., Lister C., Baxter C., Nicholls C., Nordborg M., Dean C. Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 1163–1173.
216. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses // *Curr Opin Plant Biol.* 2003. V. 6. P. 410–417.
217. Simillion C., Vandepoele K., Van Montagu M.C., Zabeau M., Van de Peer Y. The hidden

- duplication past of *Arabidopsis thaliana* // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. V. 99. P. 13627–13632.
218. Smith J.M., Haigh J. The hitch-hiking effect of a favourable gene // Genet Res. 1974. V. 23. P. 23–35.
219. Steffens N.O., Galuschka C., Schindler M., Bulow L., Hehl R. AthaMap web tools for database-assisted identification of combinatorial cis-regulatory elements and the display of highly conserved transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana* // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33 P. W397–402.
220. Stenoien H. K., Fenster C. B., Kuittinen H., Savolainen O. Quantifying latitudinal clines to light responses in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Am. J. Bot. 2002. V. 89. P. 1604–1608.
221. Stephan W., Wiehe T., Lenz M.W. The effect of strongly selected substitutions on neutral polymorphism: Analytical results based on diffusion theory // Theor Pop Biol. 1992. V. 41. P. 237–254.
222. Steponkus P.L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation // Annu. Rev. Plant. Physiol. 1984. V. 35. P. 543–584.
223. Steponkus P.L., Uemura M., Joseph R. A., Gilmour S.J., Thomashow M.F. Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* // Proc Natl Acad Sci USA. 1998. V. 95. P. 14570–14575.
224. Stinchcombe J. R., Weinig C., Ungerer M., Olsen K.M., Mays C., Halldorsdottir S.S., Purugganan M.D., Schmitt J. A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 4712–4717.
225. Stinchcombe J.R., Caicedo A.L., Hopkins R., Mays C., Boyd E.W., Purugganan M.D., Schmitt J. Vernalization sensitivity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): The effects of latitude and *FLC* variation // Am J Bot. 2005. V. 92. P. 1701–1707.
226. Stockinger E.J., Mao Y., Regier M.K., Triezenberg S.J., Thomashow M.F. Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 1524–1533.
227. Su C.F., Wang Y.C., Hsieh T.H., Lu C.A., Tseng T.H., Yu S.M. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 145–158.

228. Symonds V.V., Godoy A.V., Alconada T., Botto J.F., Juenger T.E., Casal J.J., Lloyd A.M. Mapping quantitative trait loci in multiple populations of *Arabidopsis thaliana* identifies natural allelic variation for trichome density // *Genetics*. 2005. V. 169(3). P. 1649-1658.
229. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. V. 123. P. 585–595.
230. Tajima F., Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences // *Mol Biol Evol*. 1984. V. 1. P. 269-285.
231. Takami T., Shibata M., Kobayashi Y., Shikanai T. De novo biosynthesis of fatty acids plays critical roles in the response of the photosynthetic machinery to low temperature in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol*. 2010. V. 51. P. 1265–1275.
232. Tarasov V.A., Khadeeva N.V., Mel'nik V.A., Ezhova T.A., Shestakov S.V. The *Atlg12860* gene of *Arabidopsis thaliana* determines cathelicidin-like antimicrobial activity // *Dokl Biol Sci*. 2009. V. 427. P. 332-334.
233. Thomashow M.F. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway // *Plant Physiol*. 2010. V. 154. P. 571–577.
234. Thomashow M.F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999. V. 50. P. 571–599.
235. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl Acids Res*. 1994. V. 22. P. 4673-4680.
236. Tian D., Araki H., Stahl E., Bergelson J., Kreitman M. Signature of balancing selection in *Arabidopsis* // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. V. 99(17). P. 11525-11530.
237. Toll-Riera M., Bosch N., Bellora N., Castelo R., Armengol L., Estivill X., Alba M.M. Origin of primate orphan genes: a comparative genomics approach // *Mol Biol Evol*. 2009. V. 26. P. 603-612.
238. Trontin C., Tisné S., Bach L., Loudet O. What does *Arabidopsis* natural variation teach us (and does not teach us) about adaptation in plants? // *Current Opinion in Plant Biology*. 2011. V. 14(3). P. 225-231.
239. Turesson G. The genotypical response of the plant species to the habitat // *Hereditas*. 1922b. V. 3. P. 211–350.
240. Turesson G. The species and the variety as ecological units // *Hereditas*. 1922a. V. 3. P. 100–113.

241. Tuteja N. Abscisic Acid and abiotic stress signaling // *Plant Signal Behav.* 2007. V. 2(3). P. 135-138.
242. Tuteja, N. Chapter 7 – Cold, Salinity, and Drought Stress. In: Hirt H., ed. *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*. KGaA, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2009. P. 137-159.
243. Untergrasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40(15). P. e115.
244. Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins // *Biochim Biophys Acta.* 1992. V. 1121. P. 199–206.
245. Vitalis R., Dawson K., Boursot P. Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 1811–1823.
246. Vogel J.T., Zarka D.G., van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* // *Plant J.* 2005. V. 41. P. 195–211.
247. Wang W., Zheng H., Yang S., Yu H., Li J., Jiang H., Su J., Yang L., Zhang J., McDermott J., Samudrala R., Wang J., Yang H., Yu J., Kristiansen K., Wong G.K., Wang J. Origin and evolution of new exons in rodents // *Genome Res.* 2005. V. 15(9). P. 1258-1264.
248. Wang Y., Tan X., Paterson A.H. Different patterns of gene structure divergence following gene duplication in *Arabidopsis* // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. P. 652.
249. Weigel D., Mott R. The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana* // *Genome Biol.* 2009. V. 10. P. 107.
250. Werner J. D., Borevitz J.O., Uhlenhaut N.H., Ecker J.R., Chory J., Weigel D. FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions // *Genetics.* 2005. V. 170. P. 1197–1207.
251. Wilkosz R., Schlappi M. A gene expression screen identifies EARLI1 as a novel vernalization-responsive gene in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol Biol.* 2000. V. 44. P. 777–787.
252. Wolyn D.J., Borevitz J.O., Loudet O., Schwartz C., Maloof J., Ecker J.R., Berry C.C., Chory J. Light-response quantitative trait loci identified with composite interval and eXtreme array mapping in *Arabidopsis thaliana* // *Genetics.* 2004. V. 167(2). P. 907-917.
253. Wong Y.H., Lee T.Y., Liang H.K., Huang C.M., Yang Y.H., Chu C.H., Huang H.D., Ko M.T., Hwang J.K. KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific

- phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns // Nucl. Acids Res. 2—7. V. 35. P. W588-594.
254. Wright S.I., Gaut B.S. Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants // Mol. Biol. Evol. 2005. V. 22. P. 506—519.
255. Yamazaki T., Kawamura Y., Minami A., Uemura M. Calcium-dependent freezing tolerance in *Arabidopsis* involves membrane resealing via synaptotagmin SYT1 // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 3389–3404.
256. Yang X., Tuskan G. A., Cheng M. Z. Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication // Plant Physiol. 2006. V. 142(3). P. 820-830.
257. Yoo S.Y., Kim Y., Kim S.Y., Lee J.S., Ahn J.H. Control of Flowering Time and Cold Response by a NAC-Domain Protein in *Arabidopsis* // PLoS ONE. 2007. V. 2(7). P. e642.
258. Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*. 292:686–693.
259. Zhen Y., Dhakal P., Ungerer M.C. Fitness benefits and costs of cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* // Am Nat. 2011. V. 178(1). P. 44-52.
260. Zhen Y., Ungerer M.C. Clinal variation in freezing tolerance among natural accessions of *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. 2008a. V. 177. P. 419–427.
261. Zhen Y., Ungerer M.C. Relaxed selection on the *CBF/DREB1* regulatory genes and reduced freezing tolerance in the southern range of *Arabidopsis thaliana* // Mol Biol Evol. 2008b. V. 25(12). P. 2547-2555.
262. Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2621–2632.
263. Zou C., Lehti-Shiu M.D., Thomashow M., Shiu S. H. Evolution of stress-regulated gene expression in duplicate genes of *Arabidopsis thaliana* // PLoS Genet. 2009. V. 5(7). P. e1000581.
264. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hinch D.K. Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // Plant Cell Environ. 2012. V. 35(10). P. 1860-1878.

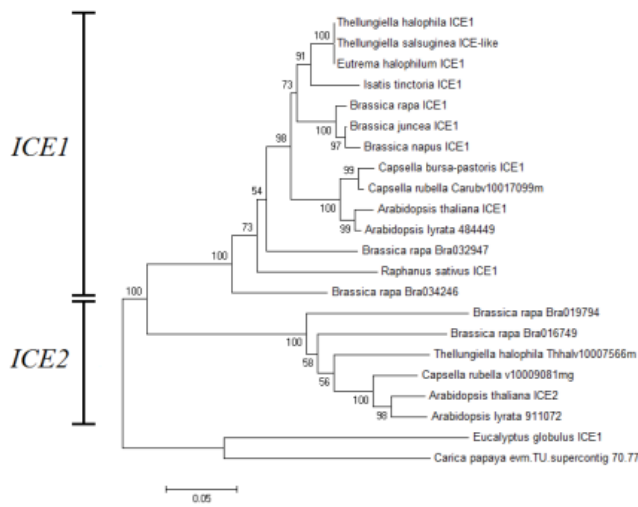
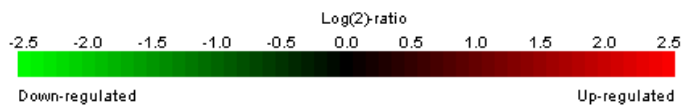


Рис. 1. Дендрограмма 20 гомологов белков ICE Капустных. Дерево было построено с помощью алгоритма NJ в программе MEGA 5.2 и укорнено относительно аминокислотных последовательностей ICE-подобных белков из *Eucalyptus globulus* и *Carica papaya*. Длина ветвей отражает число аминокислотных замен на сайт, масштаб обозначен в нижней части рисунка. Бутстреп рассчитан для 1000 повторов; только значения бутстреп > 50 нанесены на схему.

Dataset: 3250 perturbations (sample selection: AT-SAMPLES-0)
2 genes (gene selection: AT-GENES-0)



A

light study 6 (Col-0) / dark grown Col-0 seedlings
shift dark to light study 2 (tot. RNA) / dark study 6 (tot. RNA)

3250 of 3250 perturbations fulfilled the filter criteria

Gene	Filter values for AT1G12860	Log(2)-ratio	Fold-Change	p-value
AT1G12860	no filter			
AT3G26744	no filter			

B

ABA study 11 (24h) / solvent treated cell samples (24h)
BL/H3BO3 (4d) / untreated cell culture samples
ABA study 10 (20h) / solvent treated cell suspension samples (20h)
ABA + salicylic acid (24h) / solvent treated cell samples (24h)
BL/H3BO3 (2d) / untreated cell culture samples

Gene	Filter values for AT3G26744	Log(2)-ratio	Fold-Change	p-value
AT1G12860	no filter			
AT3G26744	no filter			

Рис. 2. Влияние стрессов на экспрессию генов *ICE1* (*At3g26744*) и *ICE2* (*At1g12860*). (А) Экспрессия *ICE2* повышается под действием света; (Б) Экспрессия *ICE1* повышается под действием АБК и брассинолида. Данные из GENEVESTIGATOR.

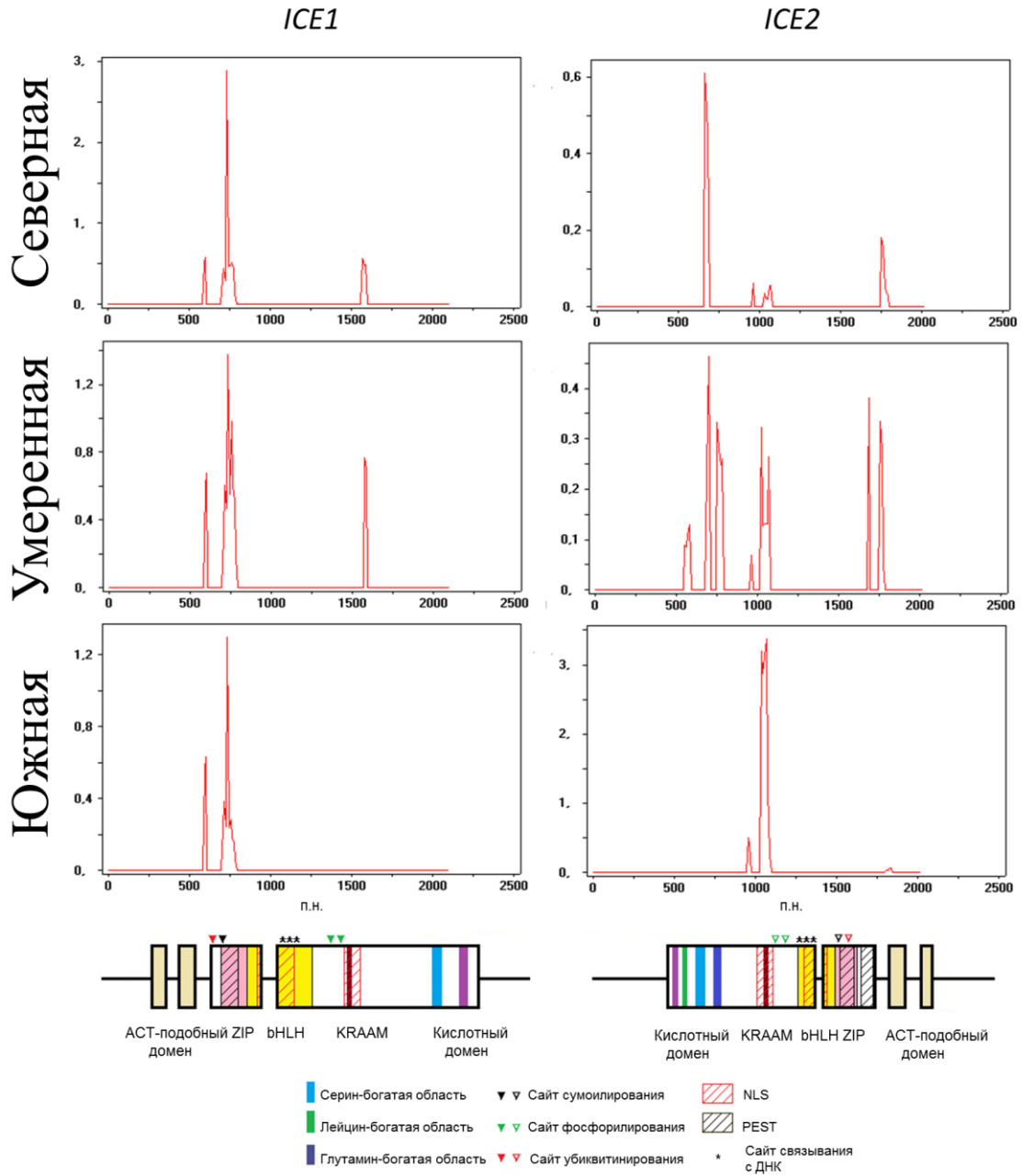


Рис. 3. Распределение соотношения π_a/π_s по генам *ICE1* и *ICE2* по группам рас. Анализ проведен по методу скользящего окна, длина окна 50 п.н., шаг 10 п.н. Позиции экзонов (прямоугольники), интронов (прямые) и консервативных доменов обозначены внизу рисунка.

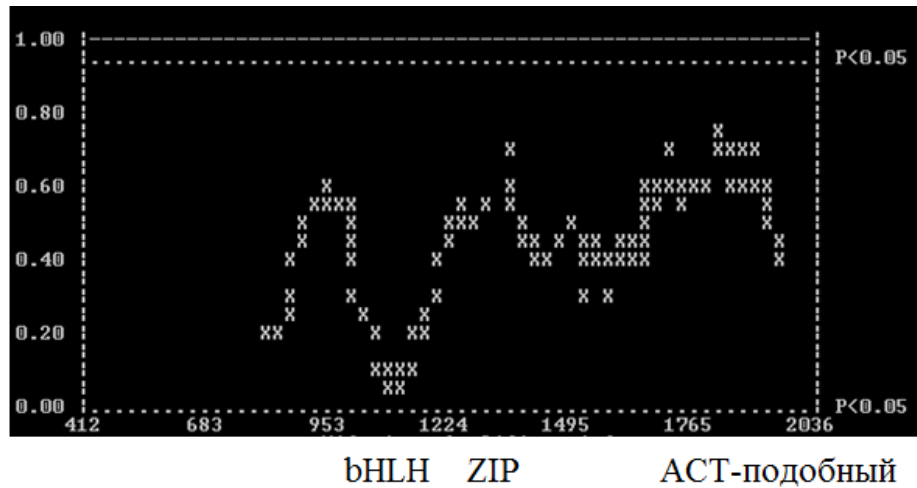


Рис. 4. Гетерогенность распределения соотношения внутривидового полиморфизма к дивергенции последовательности гена *ICE2* между *A. thaliana* и *A. lyrata*. По оси абсцисс – порядковый номер нуклеотида, ординат – соотношение полиморфизма к дивергенции. Внизу рисунка подписаны некоторые белковые домены. График получен с помощью программы DNA Slider (McDonald, 1998).

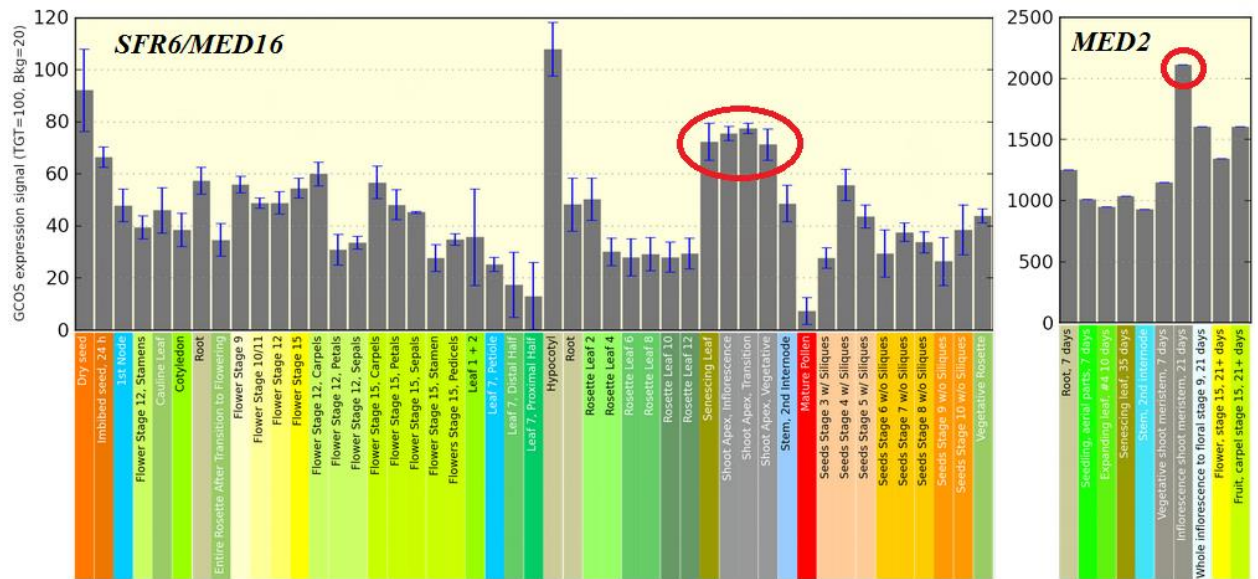


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов субъединиц медиаторного комплекса (данные микроэрепей из БД Arabidopsis e-FP Browser). Выделены столбцы, соответствующие уровню экспрессии в апикальной меристеме.

Таблица 1. Анализ расщеплений в растениях поколения Т3 при проверке на наличие селективного маркера путем обработки гербицидом “Basta”.

Трансгенные линии	Число растений, устойчивых к гербициду	Число растений, неустойчивых к гербициду	Тип расщепления (χ^2)
1	19	4	3:1 (0.71)
2	16	9	3:1 (1.61)
3	18	4	3:1 (0.54)
4	14	4	3:1 (0.07)

5	17	3	3:1 (1.06)
6	19	4	3:1 (0.71)
7	21	3	3:1 (2)
8	20	5	3:1 (0.33)
9	21	21	-
10	23	23	-
11	24	24	-
12	23	23	-
13	23	23	-
14	24	24	-
15	23	23	-

Таблица 2. Список коллинеарных генов из синтенного блока *ICE1/ICE2*, идентифицированных с помощью PGDD (Lee et al. 2012; <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>). Гены *ICE1* и *ICE2* подчеркнуты.

	Хромосома 1	Аннотация	Хромосома 3	Аннотация
1	AT1G12820	AFB3 (AUXIN SIGNALING F-BOX 3); auxin binding / ubiquitin-protein ligase	AT3G26810	AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2); auxin binding / ubiquitin-protein ligase
2	AT1G12850	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	AT3G26780	catalytic
3	<u>AT1G12860</u>	SCRM2 (SCREAM 2); DNA binding / transcription factor	<u>AT3G26744</u>	ICE1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION 1); DNA binding / transcription activator/ transcription factor
4	AT1G12880	ATNUD12 (<i>Arabidopsis thaliana</i> Nudix hydrolase homolog 12); hydrolase	AT3G26690	ATNUDX13 (ARABIDOPSIS THALIANA NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 13); bis(5'-adenosyl)-pentaphosphatase/ hydrolase
5	AT1G12900	GAPA-2 (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT 2); NAD or NADH binding / binding / catalytic/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AT3G26650	GAPA (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ protein binding
6	AT1G12910	ATAN11 (ANTHOCYANIN11); nucleotide binding	AT3G26640	LWD2 (LIGHT-REGULATED WD 2); nucleotide binding
7	AT1G12920	ERF1-2 (EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1-2); translation release factor	AT3G26618	ERF1-3 (eukaryotic release factor 1-3); translation release factor
8	AT1G12950	MATE efflux family protein	AT3G26590	MATE efflux family protein
9	AT1G12970	leucine-rich repeat family protein	AT3G26500	leucine-rich repeat family protein
10	AT1G12990	glycosyl transferase family 17 protein	AT3G26445	glycosyl transferase family 17 protein
11	AT1G13000	unknown protein	AT3G26440	unknown protein
12	AT1G13020	eukaryotic translation initiation factor, putative (EIF4B5)	AT3G26400	EIF4B1; translation initiation factor
13	AT1G13050	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN:	AT3G26350	LOCATED IN: chloroplast; EXPRESSED IN: pedicel, root,

		biological_process unknown; EXPRESSED IN: 14 plant structures; EXPRESSED DURING: 9 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Harpin-induced 1 (InterPro:IPR010847); BEST <i>Arabidopsis thaliana</i> protein			carpel, stamen; EXPRESSED DURING: 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Harpin-induced 1 (InterPro:IPR010847); BEST <i>Arabidopsis thaliana</i> protein match is:
14	AT1G13060	PBE1; endopeptidase/ peptidase/ threonine-type endopeptidase	AT3G26340		20S proteasome beta subunit E, putative
15	AT1G13090	CYP71B28; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	AT3G26210		CYP71B23; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
16	AT1G13110	CYP71B7; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	AT3G26150		CYP71B16; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
17	AT1G13130	glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family protein	AT3G26130		glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family protein
18	AT1G13140	CYP86C3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	AT3G26125		CYP86C2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding

Таблица 3. Дополнительные вероятные цис-элементы в промоторной области генов *ICE1* и *ICE2*, предсказанные с помощью AthaMap и PLACE. Представлены высоконсервативные элементы из генома разных видов растений, состоящие не менее чем из 6 нуклеотидов.

Ген(ы)	Название сайта	Консенсусная последовательность	ТФ	Семейство	Функция	Источник
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	OSE1ROOT NODULE	AAAGAT	-	-	Активация экспрессии в инфицированных клубеньковых клетках	сем. Бобовые
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	PYRIMIDIN EBOXOSR AMY1A	CSTTTT	BPBF	DOF	Ответ на гиббереллин	<i>Oryza sativa</i> , <i>Hordeum vulgare</i>
<i>ICE2</i>	GARE2OSR EP1	TAACGTA	-	-	Ответ на гиббереллин	<i>Oryza sativa</i>
<i>ICE2</i>	MYBGANV	TAACAAA	-	-	Ответ на гиббереллин	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>ICE2</i>	PYRIMIDIN EBOXOSR AMY1A	CSTTTT	-	-	Ответ на гиббереллин	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>ICE2</i>	REALPHAL GLHCB21	AACCAA	-	-	Регуляция фитохромом	<i>Lemna gibba</i>
<i>ICE1</i> , <i>ICE2</i>	REBETALG LHCB21	CGGATA	-	-	Регуляция фитохромом	<i>Lemna gibba</i>
<i>ICE1</i>	AACACOR EOSGLUB1	AACAAAC	-	-	Экспрессия в эндосперме	<i>Oryza sativa</i>
<i>ICE1</i>	GT1GMSC AM4	GAAAAA	-	-	Ответ на патогены и солевой стресс	<i>Glycine max</i>
<i>ICE1</i>	LREBOXIP CCHS1	AACCTAACCT	-	-	Ответ на свет	<i>Petroselinum crispum</i>
<i>ICE1</i>	RYREPEAT BNNAPA	CATGCA	-	-	Экспрессия в семенах	<i>Brassica napus</i>

Последовательности генов *ICE1* и *ICE2*, зарегистрированные в GenBank NCBI

KM593299 Arabidopsis thaliana inducer of CBF expression 1 (ICE1) gene, ecotype Cvi-0, complete cds.

aattcttgagcatagctttaagatgaacataaatggaagtaaacattgctaataaagggtgaaagtattgatccaacaacaacaacctcaagttctcaaaagcttaattaaaaaacactctcatt
gcaattgcattacatgcttagattgaagttatgacataagaaaaaagttgagaagaaaattgcagatttaaaggacttagttctcttagctctgcttcaacagatgcttaagtgactcgaagtc
ggatcagaTCAGATCATACCAGCATACCCTGCTGTATCGAAAAGCACTGCTTTGATTTGATCAGGCAGTATCTCTTGT
CTTCTTGGCATTGctgatagacaaaagaaaacatgttactactaaaactgttctacaatccttaaccttcaactgagagtagaagatcacCTCAGCGCGGAAAAC
ATCCAAGGCAAACCCATTA AAAACAGCTGATCACAGCTTGTGTAACATCCAATCCAAGATTATCCAAAGCTTTCATG
GTAGCGAGCAAACAGACCCGGTCTACGACCACAGAACATATGAATGTTCACTGCTCTTCCCTTCCCTTAATCTAACCT
CAACctgtgaaaaagaagcagagtaactctcaaacatgaatcttgtttctcttccagcttaagcaaaagtatacagaatatagtccttacTCTAGCTTGTGTCCTTTA
GGACTTGGTAAAGAAGAGGGACACAACCTTTCCTTGACACGACAAGAAAAGAGTTTGC GGGTGTAGGTGTCAACGGA
TGGAAGCTTGATGAAGTTGGAGGCAAAGATCCAGGAGGAGTTGACTCAAGTTCATTGTGAAGATCATTGATCCTTT
GTAGAAGTTCCTCAGATAATCAATTGCATCTCCAAGTATTGATGCTCTATCCATctgcaaatcatcgaaaatcctataaaactatcac
gagcctcttctcaaaagataaagcaactacatgcaagttgacaacaacaagcctcaaaagctacaacaacaacaattctatacagcaacaagtaacaagctcttaaggagata
aaagagacaagtaagtgtttacTTTGTGATCTTGGGGACAACCTGATCTAAGCATATAAAGCCTATCATTAAGCTTCTTCCCTCT
TCTCCTCTCAGCCATCAGATTCTTAGCAGGCATACCTTTCTTACCCTTTCTCCTCCTCCAATCTGAACACTCTC
AGCCGCTTACCCTCTCATTTATCTCATCAGACTCATAGTTCAACCCAGAAAACCTCAATCCCAGTCTCATCCATAT
CTCCATCATCACTAAACCTCCTCATTCCTGAACTCTCCGAATTTCCCATTTTGCCTCCAGAGCTCTGACGCATAGCT
GCACGTTTCTGGAACAGAGTAGGCTGTGCACCAGACGATGCTAACACCTCTAAAGGCTTCAGAACTTTCGCTCTGT
TCCCAACA AAAAGTTCAGACTACCAAAAACCTTCCAACCTCAACGGAGCTGTGAAACCACCACACAACA
TTGTGTTTGTGTTGTTGTTTCCGGCGCAAGAGTGACCGAGCAGACAAGAAATCAGGAACAGAACTCAAATCCCT
GTTCCCAATTGTGTCAAAGAACCAACCCCATCGAAATAGGAGCATGGATTGGTTAAGAAAACCAGATTCAGA
GCCAACTCAAAGCATTATCAAAAAGGTTTGCAGAAGAAGGAACATTGAGAAGACAACCTTGTGTTGTTAGT
TGACAAGA ACTGATTTTGTGAGAAGGGTCAAGACTAAAAGCTTGAGAAGGAGAACAAGAAGAAGAATCAA
TAGAGTGTGAAGAAGAAGATTATCATTAGGGTAAAAGGAAAACCGATTCTGTAACATCTGAAGATCTTGTTGGA
TGTGTTGTTACTACTAAACCAATCACCTTCAAGCATAGGCTTAAACTGAGAAGAACCATTCTTGATTCTTCC
CCATGAACCTTCCCTCGTCTCTTCCCTTCTCCACCACCACCGTTTAAACCAACCCCTCACCATTGTTTCCGTC
GACCCATCGCAAAGTTGACACCTTACCCCAAGCTGAACTTTAGAGGAAAATTCTGCAAAAGTTCAGACTT
AACTGAAATTTGGAAGCTTGAAGACAATTCTGCAAAAGTTGAAAACA AAAAGATATATACTTTGAATATT
ACTTGGAAAAGTAAAAAAGAGAAGCATTAAAGTAGAATCACGAGGATTTTATGAATTGAAGAAGCGAAATCTG
AAAAGGAAGATAGAGATAGAGAGAGAGAATGATAGATTCTTCTCAGAGCTTCAAAAATTGAAACTTTTTTTTT
GAT

KM210288 Arabidopsis thaliana inducer of CBF expression 2 (ICE2) gene, ecotype Cvi-0, complete cds.

CAAAAAAAAAATGAGAGAGAGGTGGCAAAGATGAAGTGGAGGTGAGAGACGGAAAGCAAAAACAATAGTCACGA
GAATCAACACCAACTCTTAAACCAAGATAGACCAAGAAACCAACAGAGTAAATAAATGGTGGCCTTGACAACAT
TGAAATCCCCAAAATCTCAACTTTTTAGGGTTTTCGAGCTCTGAAATCTCTCTATCTTTCTTCTCAGATTTCTCAC
TTTTCTTCTTTCATAAGATCCTCGTGATTCCACTTTATAACGTACGCCTCTTTCAAGAAAAATCTCTCTATATT
ATCTACGTTTCTCTCGCTTGTCTCCTTTGAGGTTCCATTTCTACTTCTTCCAAAATTCGAAACTTTTCCACTCTC
TCTCTCTCTACTAGTTTGACATGAACAGCGACGGTGTGGCTTGACGGCTCCGGTGAATCTCCGGAGGTTAATA
ACGGTGAAGTGCCTTGGGTCAGAAACCCAGATGAAGACTGGTTCAATAACCCACCACCACCAACAACACTA
ATCAAAACGACTTCAGATTCAATGGTGGGTTTCTTTAAACCCCTCAGAGAATCTGCTTCTTCTTTCAGCAATCG
ATTGATTCTTCTTCTTCCGTTATTACATCTTTACACTCAACGCTACTTCACAGCAACAACAACAGGAACA
GTCTTTCTTAGCTACAAAAGCTTGTATAGTTTCTTCTTCAACGTCCCAACCATCAATAACAACACTTTTCGATGACT
TCGGCTTTGACTCTGGTTTCTTAGGACAACAATTCCATGGAAATCATCAATCTCCGAACTCGATGAATTCACATGGC
TTAAACCACTCAGTACCGGATTTTCTTCCAGCTCCGGA AAACAGCTCTGGATCATGTGGATTGAGTCTCTGTTCTC
GAACAGAGCAAAGTTTTAAACCGTTACAGGTAATGGCTTCACTGGCTCGCAGCCAACCTGTTTTCAGAAACGA
GCTGCAATCGCTCAGAGTTCGACTAGCAAAATCAGAGACTGAGAGTCTTCTGAAATGAGGAAATCGAGCTAC
GAGAGAGAGATTGACGATACTAGTACCGGAATCATCGATATCTCTGGATTGAATTCAATCTGATGACCATAAT
ACTAATAACAACAAGGTAAGAAGAAGGAATGCCTGCAAAGAACCTTATGGCTGAGAGAAGAAGAAGGAAGAA
GCTTAATGATAGGCTTACATGCTTAGATCAGTTGTTCCCAAGATCAGCAAAGTAACCAAATAGACTCTTTCTTTTT
TCTCTTGTCTCCTTAACTTCTTGGCTCACTAATTTGGGTTGAAAATGTAGATGGATAGAGCATCAATACTT
GGAGATGCTATTGATTACCTCAAAGAGCTTTTACAAAAGAAATCAACGATCTTACATACCGAACTCGAATCTACTCCAC
CGAGTTCTTCAAGCTTGCATCCGTTAACACCGACTCCACAACGCTGTCTTACCCTGTTAAGGAAGAGTTGTGTCT
ATCTCTCCTTGGCAAGCCCTAAAGGCCAGCAACCAAGAGTAAGGATAAGCTCAATTTATTGTTCAGTGGACGAAA
CTGGATTCTGTAAATTTGCTTAGTGTAAGGCTTCTTGTTTTGATATAGGTTAGGTTAGATTAAAGAGAAGGAAAGG
CAGTGAACATTCACATGTTCTGTGGACGTAGACCAGGCTTTTTACTTTCCACCATGAGAGCTTTGGATAACTTAGG
ATTGGATGTTCAACAAGCTGTGATTAGCTGTTTCAACGGTTTTGCTTTGGATGTTTTCCGCGCTGAGGTAATATAGT
TGTTAAGATGCTATGCTGATCACTGATTAGTAAAACCTAGCAGTCAAAGAATAGTTATTTGAGAGAATGATTTGTAT
ATAAGTAACAACATGTTTTATGTTTCTAATCAGCAATGTCAAGAAGACCATGACGTGTACCTGAACAAAATCAAAG
CAGTGTCTTTAGATACAGCAGGTTACGCTGGTTTGGTTTATTGCGAAGCAGAAGGAAGCATCTGTGTGGAACAGA
GCTAGATCTAAGTCTTGTCTGTTTTAGTCAGCAATTTCTTACTTAGTTTCATCATTTTTAATCAGTGTATTGAAG
ATGATAACTACTTAAATTTAGCTTCGAAAACATGTGTTTCGAGTACAATAGTTTCAACCTTTGAGCAAAAATGCCATT
GTTTCTCAATAATCTACTTTGCTTTTCA