

На правах рукописи

ФИЛЮШИН МИХАИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и
родственных видов секции *Allium***

Специальность: 03.02.07 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в группе молекулярных методов анализа генома лаборатории системной биологии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
КОЧИЕВА Елена Зауровна,
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», ведущий
научный сотрудник

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
ХРУСТАЛЕВА Людмила Ивановна,
главный научный сотрудник Центра
молекулярной биотехнологии, профессор
кафедры генетики, биотехнологии,
селекции и семеноводства РГАУ-МСХА
имени К.А. Тимирязева, Москва

кандидат биологических наук, доцент
БРУСКИН Сергей Александрович,
заведующий лабораторией
функциональной геномики Института
общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук, Москва

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта Российской академии наук,
Москва

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8 (499) 135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие методов молекулярного анализа генома и высокопроизводительного секвенирования ознаменовало новую эру в изучении структуры и организации геномов растений. Исследование генетического разнообразия культивируемых и дикорастущих растений – приоритетное направление современной генетики растений. Оценка уровней полиморфизма как генома в целом, так и отдельных генов и генных семейств, в том числе определяющих устойчивость к абиотическим стрессам и фитопатогенам и другие хозяйственно-ценные признаки, представляет несомненный научный и практический интерес. Идентификация с помощью молекулярных маркеров ценных генотипов, несущих определенные аллели или пулы генов, применяется в селекционном процессе, что значительно сокращает сроки создания новых сортов растений (Collard and Mackill, 2008; Хлесткина, 2011).

Род *Allium* L. (сем. Amaryllidaceae) является одним из крупнейших родов однодольных растений и включает ряд овощных культур. По объему производства наиболее экономически значимыми представителями рода являются лук репчатый *A. cepa*, чеснок *A. sativum* и лук-порей *A. porrum* (FAO, 2014). Другие виды луков выращиваются локально и значимы в определенных странах, например, *A. odorum* (лук джусай) и *A. tuberosum* (лук резанец) широко возделываются в Юго-Восточной Азии. Некоторые виды (*A. fistulosum*, *A. altaicum*, *A. vavilovii*) являются донорами хозяйственно-ценных признаков для селекции культивируемых видов луков. Секция *Allium*, включающая как культивируемые (чеснок, лук-порей, рокамболь), так и редкие и эндемичные виды (*A. iranicum*, *A. regelianum*, *A. tuncelianum*), считается активно развивающейся, и сложности с систематикой связаны в первую очередь с тем, что многие виды имеют общий ареал и могут скрещиваться друг с другом (Hanelt, 1996). Также у ряда видов *Allium* существуют четные и нечетные полиплоидные ряды (Mathew, 1996; Peruzzi et al., 2016), что значительно усложняет изучение филогении данной секции.

Чеснок *A. sativum* начали возделывать около 5000 лет назад в Средней Азии, откуда по торговым путям проник в Средиземноморье, на Ближний Восток и Египет, а к XIX веку распространился по всему миру (Ipek et al., 2005). Активному распространению чеснока способствовали его высокая экологическая пластичность, устойчивость к широкому кругу патогенов, а также способность к долгому хранению. Первичный центр происхождения чеснока – Центральная Азия, вторичный центр находится в Средиземноморье (Vavilov, 1951; Etoh and Simon, 2002).

Несмотря на высокую значимость чеснока *A. sativum*, его геном, в отличие от лука репчатого *A. cepa* и других овощных культур, исследован слабо. До сих пор остается открытым вопрос о происхождении *A. sativum*, и не определено его положение в секции *Allium*. Анализ общего геномного полиморфизма и вариабельности отдельных генов и

некодирующих участков *A. sativum* позволит исследовать генетическое разнообразие данного вида.

Цели и задачи исследований. Целью работы стало изучение геномного полиморфизма чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение вариабельности селективно-нейтральных областей генома методом AFLP и адаптивно-значимых последовательностей методом NBS-профайлинга у образцов *A. sativum* различного эколого-географического происхождения;

2. Оценка внутривидового полиморфизма *A. porrum* методами AFLP и NBS-профайлинга, сравнение уровней вариабельности с вегетативно размножаемым *A. sativum*;

3. Изучение генома представителей секции *Allium* с помощью метода AFLP и анализа некодирующих участков ядерного и цитоплазматических геномов для определения генетических расстояний между видами и выявления возможных филогенетических отношений внутри секции;

4. Определение полной нуклеотидной последовательности пластидного генома чеснока *A. sativum*;

5. Идентификация генов, кодирующих белки холодового шока у *A. sativum* и родственных видов; определение паттернов экспрессии этих генов в вегетативных органах *A. sativum* при нормальных температурных условиях и при холодовом стрессе.

Научная новизна. Впервые исследован полиморфизм селективно-нейтральных и адаптивно-значимых участков генома у 80 образцов *A. sativum* из коллекции ВИР различного эколого-географического происхождения, представляющих современный культигенный ареал чеснока, а также центр происхождения данного вида. Впервые проведен анализ геномного полиморфизма методом AFLP и анализ вариабельности восьми некодирующих участков ядерного, хлоропластного и митохондриального геномов у представителей секции *Allium*, что позволило определить филогенетические отношения внутри секции, а для ряда образцов уточнить их таксономический статус. Впервые определена полная нуклеотидная последовательность пластидного генома чеснока *A. sativum* и проведен сравнительный анализ с пластомом *A. cepa*. Впервые для видов *Allium* идентифицированы и описаны гены, кодирующие белки холодового шока и определены паттерны их экспрессии при нормальных температурных условиях и при холодовом стрессе. Впервые для растений показано существование белков холодового шока с восемью цинковыми пальцами.

Теоретическая и практическая значимость. Молекулярный анализ генома представителей секции *Allium* позволил определить генетические расстояния между видами, изучить филогенетические отношения между исследуемыми видами секции, а также определить положение и уточнить таксономический статус некоторых видов. Идентифицированные среди анализируемых образцов *A. sativum* генотипы, отличающиеся по

спектрам AFLP-фрагментов и пулу генов устойчивости, могут в дальнейшем быть вовлечены в селекционный процесс для создания новых сортов чеснока.

Объект и предмет исследований. Объектом исследования послужила коллекция клонов чеснока *A. sativum* различного эколого-географического происхождения из ВИР (составлена куратором коллекции В.А. Семеновым), а также образцы дикорастущих видов *Allium*, предоставленные проф. Н. Фризенем (Ботанический сад университета Оснабрюк, Германия) и проф. Р. Фритчем (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Гатерслебен, Германия). Предмет исследований – оценка полиморфизма как всего генома в целом, так и отдельных его участков у *A. sativum* и родственных видов.

Апробация работы и публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 в рецензируемых научных журналах. Материалы работы были представлены на отечественных международных конференциях, в том числе на «Molecular Phylogenetics MolPhy-3» (г. Москва, 2012), VI съезде ВОГиС (г. Ростов-на-Дону, 2014), симпозиуме «Генетика и геномика растений для продовольственной безопасности» (г. Новосибирск, 2016) и конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (г. Ялта, 2016).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа изложена на 141 страницах, содержит 12 таблиц и 41 рисунок. Список литературы включает 231 источник.

Личный вклад автора. Большая часть представленных в диссертационной работе результатов была получена автором лично. Амплификация некодирующих последовательностей генома проводилась совместно с к.б.н. Н.Н. Рыжовой. Секвенирование пластидного генома и сборка чтений была осуществлена к.ф.-м.н. А.М. Мазуром (ЗАО «Геноаналитика»).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована коллекция 80 образцов чеснока *A. sativum* различного эколого-географического происхождения (ВИР), образцы дикорастущих видов *Allium* из Средиземноморья и Средней Азии, предоставленные Н. Фризенем и Р. Фритчем. Созданная коллекция ДНК включала 153 образца рода *Allium*. Для оценки геномного полиморфизма были использованы современные методы анализа, такие как AFLP, NBS-профайлинг, секвенирование некодирующих участков ядерного и цитоплазматических геномов. Полная последовательность пластидного генома *A. sativum* определена методом высокопроизводительного секвенирования (Illumina HiSeq1500). Расчет генетических расстояний и РСo-анализ проведены в программе Past3. Дендрограммы построены в программе TREECON 1.3b. и MEGA 7.0. Анализ популяционной структуры проведен с использованием программы STRUCTURE 2.3.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ полиморфизма генома *A. sativum* методами мультилокусного анализа

Методом AFLP проведен анализ 80 образцов чеснока *A. sativum* из коллекции ВИР, представляющих современный культивируемый ареал чеснока, а также центр происхождения данного вида. Всего было получено 307 фрагментов, 202 из которых были полиморфными для образцов *A. sativum*. Внутривидовые генетические расстояния (GD) *A. sativum* варьировали от 0,06 до 0,72 (GD_{ср}=0,37), что является крайне высоким значением для вегетативно размножаемого растения и сопоставимо с уровнями полиморфизма как самоопыляемых (Turpeinen et al., 2003; Дьяченко и др., 2014), так и перекрестно опыляемых (Carr et al., 2003) видов растений. Полученные значения GD совпадают с определенными ранее. Согласно данным ISSR-анализа, генетические расстояния между тунисскими образцами чеснока варьировали в пределах 0,34-0,45 (Jabbes et al., 2011), а у образцов чеснока из Ирана среднее значение составило 0,33 (Shaaf et al., 2014). Столь высокие значения генетических расстояний, по-видимому, можно объяснить существованием у *A. sativum* альтернативных половому размножению механизмов, позволяющих поддерживать высокое генетическое разнообразие вида.

Кластерный анализ не выявил зависимости разделения исследуемых образцов *A. sativum* на группы от их географического происхождения, за исключением нескольких пар. На PCo-графике также отсутствует такая зависимость: почти все анализируемые образцы образовали единую дисперсную группу, за исключением шести образцов (57 ('Perla', Аргентина), 68 (k251, Испания), 72 (k18, Болгария), 56 (k253, Перу), 59 (k242, Бенин) и 77 (k113, Прим. край, Россия)) (рис. 1).

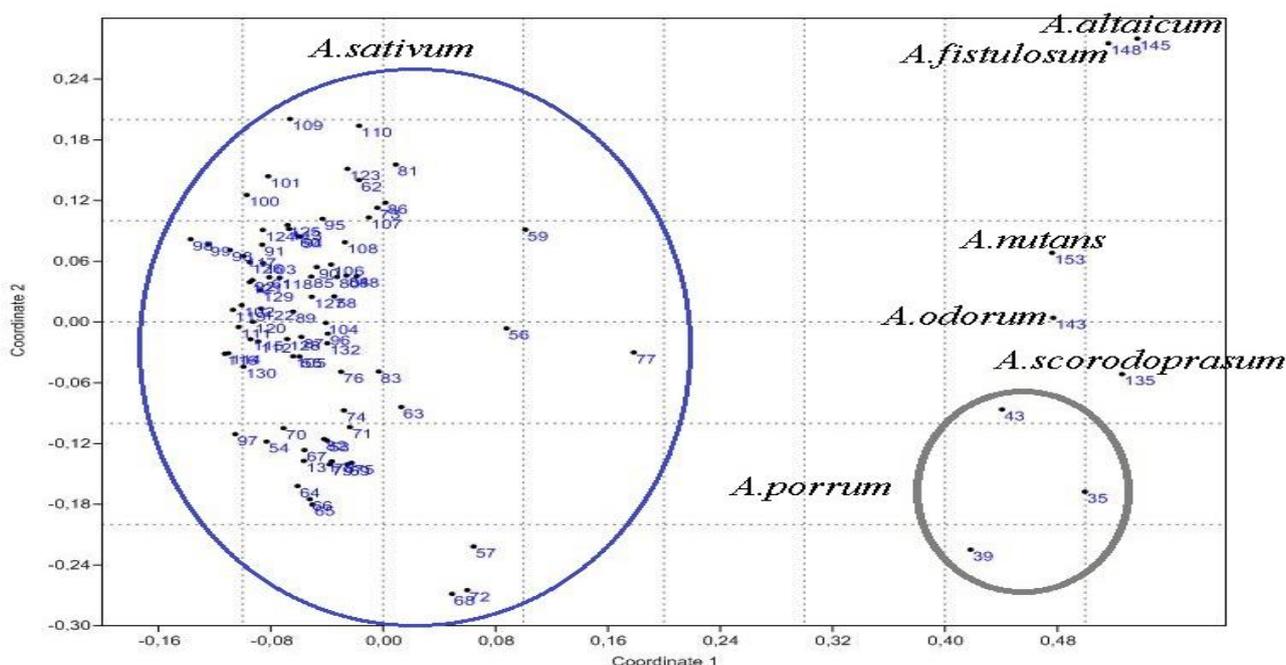


Рисунок 1. PCo-анализ распределения исследуемых образцов *A. sativum* и родственных видов по результатам AFLP-анализа

По результатам анализа популяционной структуры исследуемые образцы разделились на восемь групп (рис. 2), однако только у некоторых образцов преобладает один набор ДНК-фрагментов (тип генома) (на рисунке это образцы с преобладающим одним цветом), у большинства же образцов чеснока совмещено в разных соотношениях по несколько наборов ДНК-фрагментов.

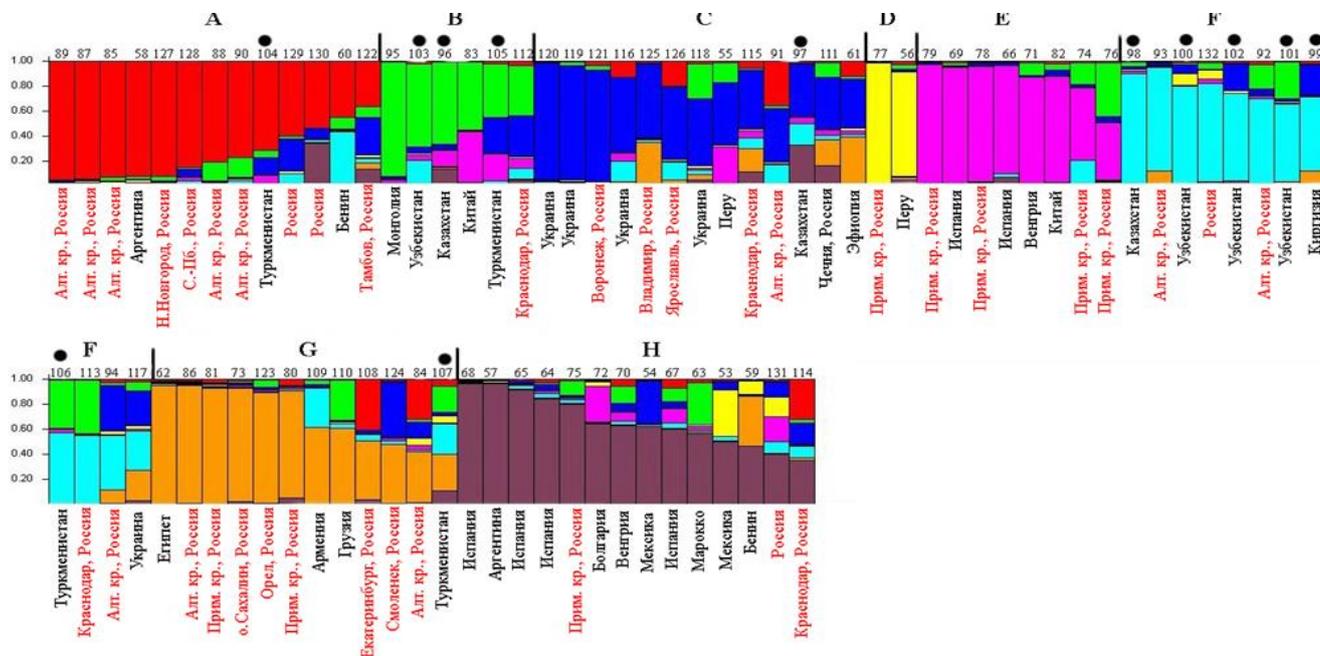


Рисунок 2. Анализ популяционной структуры исследуемых образцов *A. sativum* по результатам AFLP-анализа. Точками отмечены образцы из первичного центра происхождения; образцы из России подписаны шрифтом красного цвета

Образцы из первичного центра происхождения распределились по группам неравномерно. В группах оказывались образцы как из первичного центра происхождения, так и из культивируемого ареала, что может быть объяснено активным распространением чеснока за счет торговли. Подобное независимое от происхождения распределение было описано ранее по результатам анализа небольших выборок образцов *A. sativum* (Irek et al., 2003; Chen et al., 2014).

Анализ полиморфизма семейства генов резистентности чеснока *A. sativum* методом NBS-профайлинга

На той же коллекции из 80 образцов чеснока *A. sativum* впервые методом NBS-профайлинга был проведен анализ вариативности адаптивно-значимых последовательностей семейства R(RGA)-генов. Из 209 выявленных NBS-фрагментов 132 были полиморфными для анализируемых образцов *A. sativum*. Ни для одного из исследуемых образцов *A. sativum* не выявлено образец-специфичных фрагментов. Генетические расстояния между образцами *A. sativum* оказались высокими ($GD=0,10-0,68$), что сопоставимо с полиморфизмом R-генов у других сельскохозяйственных культур. Например,

генетическое разнообразие сортов озимой пшеницы по результатам NBS-профайлинга варьировало от 0,15 до 0,5 (Sayar-Turet et al, 2011), но, в отличие от чеснока, для пшеницы характерно генеративное размножение, и активно ведется её селекция на устойчивость к фитопатогенам. Высокий уровень вариабельности семейства R-генов у *A. sativum* может быть причиной экологической пластичности данного вида и его устойчивости к широкому кругу фитопатогенов.

Проведенный кластерный анализ, как и по результатам AFLP-маркирования, не выявил зависимости разделения исследуемых образцов чеснока на группы от географического происхождения: группы объединяли образцы как из первичного центра происхождения, так и из современного культивируемого ареала.

На PCo-графике анализируемые образцы чеснока сформировали протяженную группу (рис. 3), от которой несколько дистанцированы образцы 60 (k297, Бенин), 70 (k294, Венгрия) и 103 (k31, Узбекистан). Популяционный анализ разделил исследуемые образцы *A. sativum* на 8 групп, однако состав этих групп не совпадал с данными AFLP-анализа, где также было выявлено разделение на 8 групп (рис. 4). Как видно на рис. 4, образцы из первичного центра происхождения распределились по группам неравномерно. Образцы, содержащие в разных долях различные типы пулов NBS-фрагментов, могут быть рекомендованы для включения в селекционный процесс для создания новых, устойчивых к фитопатогенам сортов *A. sativum*.

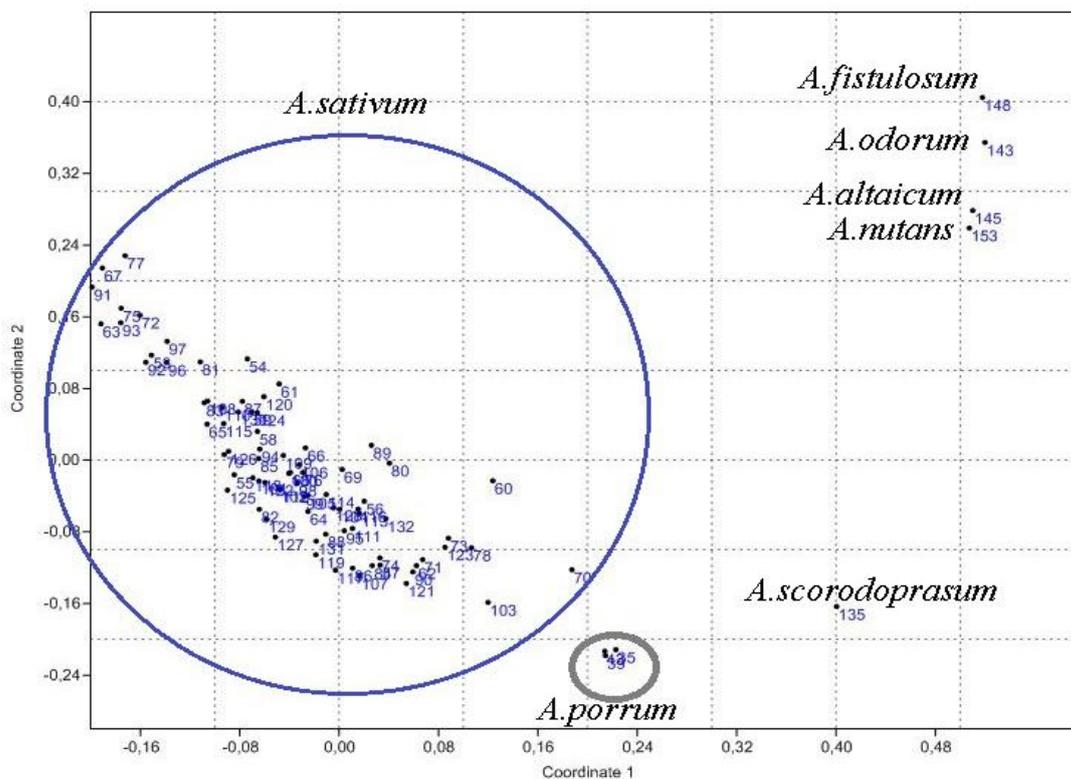


Рисунок 3. PCo-анализ распределения исследуемых образцов *A. sativum* и родственных видов по результатам NBS-профайлинга

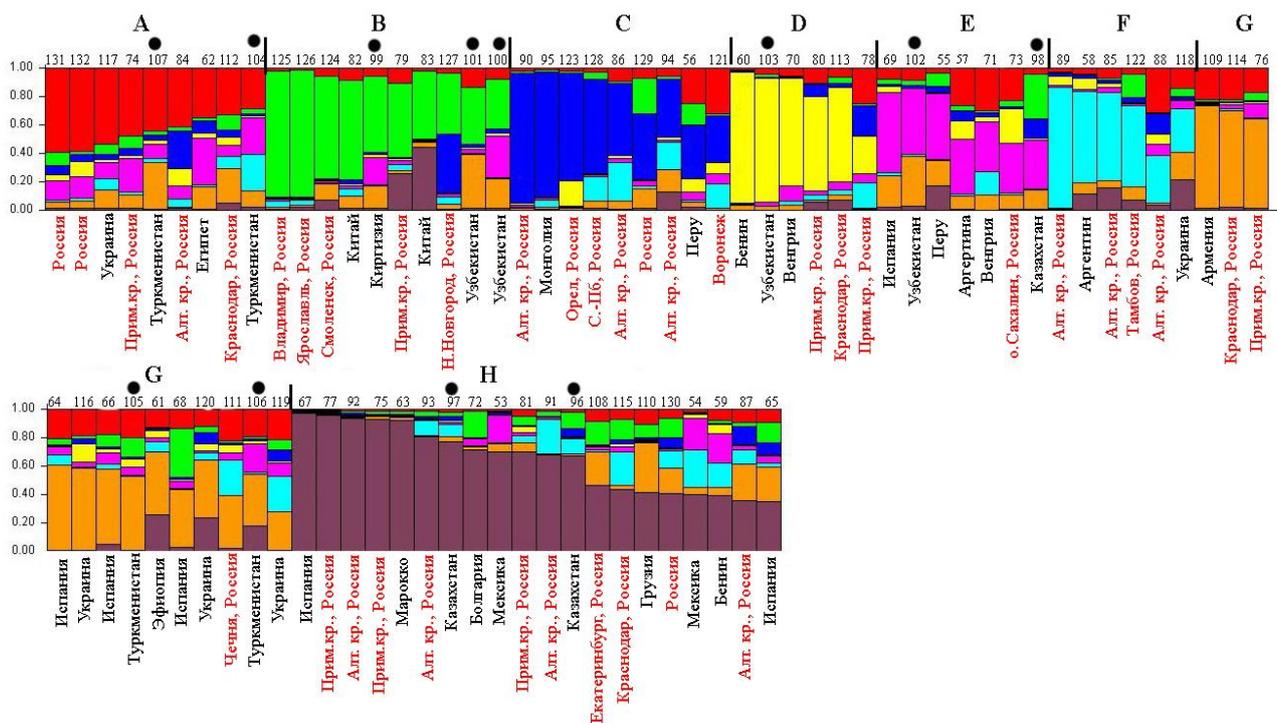


Рисунок 4. Анализ популяционной структуры исследуемых образцов *A. sativum* по результатам NBS-профайлинга. Точками отмечены образцы из первичного центра происхождения; образцы из России выделены красным шрифтом

Анализ полиморфизма генома лука-порея *A. porrum*

Для сравнительной оценки геномного полиморфизма *A. sativum* методами AFLP и NBS-профайлинга был исследован внутривидовой полиморфизм у другого культивируемого вида секции *Allium* – *A. porrum* (лук-порей), который является перекрестно-опыляемым. В результате AFLP-маркирования для каждого из 16 сортов были получены специфичные ДНК-спектры. Уровень геномного полиморфизма *A. porrum* варьировал от 0,11 до 0,32 ($GD_{cp}=0,18$), что ниже полиморфизма вегетативно размножаемого *A. sativum* ($GD_{cp} = 0,37$). По данным NBS-профайлинга, генетические расстояния между образцами лука-порея варьировали в пределах 0,01-0,20 ($GD_{cp}=0,12$), что также значительно ниже вариабельности семейства R-генов *A. sativum*. Низкий уровень полиморфизма *A. porrum* может быть связан с тем, что данный вид не имеет дикорастущих популяций (доноров разнообразия) и известен только в культуре.

Анализ генома представителей секции *Allium* методами мульти- и монолокусного анализов.

Анализ межвидового геномного полиморфизма у представителей секции *Allium* методом AFLP. Для AFLP был сформирован набор из 64 образцов ДНК, 47 из которых относятся к 16 видам секции *Allium*. В качестве внешней группы были взяты образцы 8 видов из других подродов рода *Allium*, а также виды других родов порядка *Asparagales*. Всего было идентифицировано 613 фрагментов, из них 279 (45,5%) были полиморфными для

представителей секции *Allium*. Были идентифицированы фрагменты, присущие всем исследуемым образцам рода *Allium*, специфичные для представителей секции *Allium*, а также характерные для видов и образцов.

Генетические расстояния между видами секции *Allium* варьировали от 0,22 до 0,71. Расстояния между видами секции *Allium* и видами других подродов составили 0,76-0,93, а между видами секции *Allium* и видами родов порядка *Asparagales* – 0,95-1,00.

На дендрограмме исследуемые образцы видов рода *Allium* сформировали единый кластер с высоким уровнем бутстреп-поддержки (ИБ=100), внутри которого представители секции *Allium* объединились в обособленный субкластер (ИБ=100) (рис. 5).

Почти все исследуемые виды секции *Allium* образовали видовые кластеры, виды *A. baeticum*, *A. commutatum*, *A. polyanthum* и *A. pseudoampeloprasum*, каждый из которых представлен одним образцом, формировали базальные ветви к некоторым видовым субкластерам. Образцы *A. sativum* объединились в единый субкластер (ИБ=93) с *A. longicuspis*, который по результатам проведенных ранее молекулярных исследований считается наиболее вероятным предком современного чеснока (Ipek et al., 2008; Zohary and Nopf, 2012). Вид *A. tuncelianum*, который имеет схожие морфологические признаки и также считается предком чеснока (Mathew, 1996), сформировал обособленный кластер, близкий к подкластеру *A. sativum*, однако, характеризовавшийся крайне низким уровнем бутстреп-поддержки.

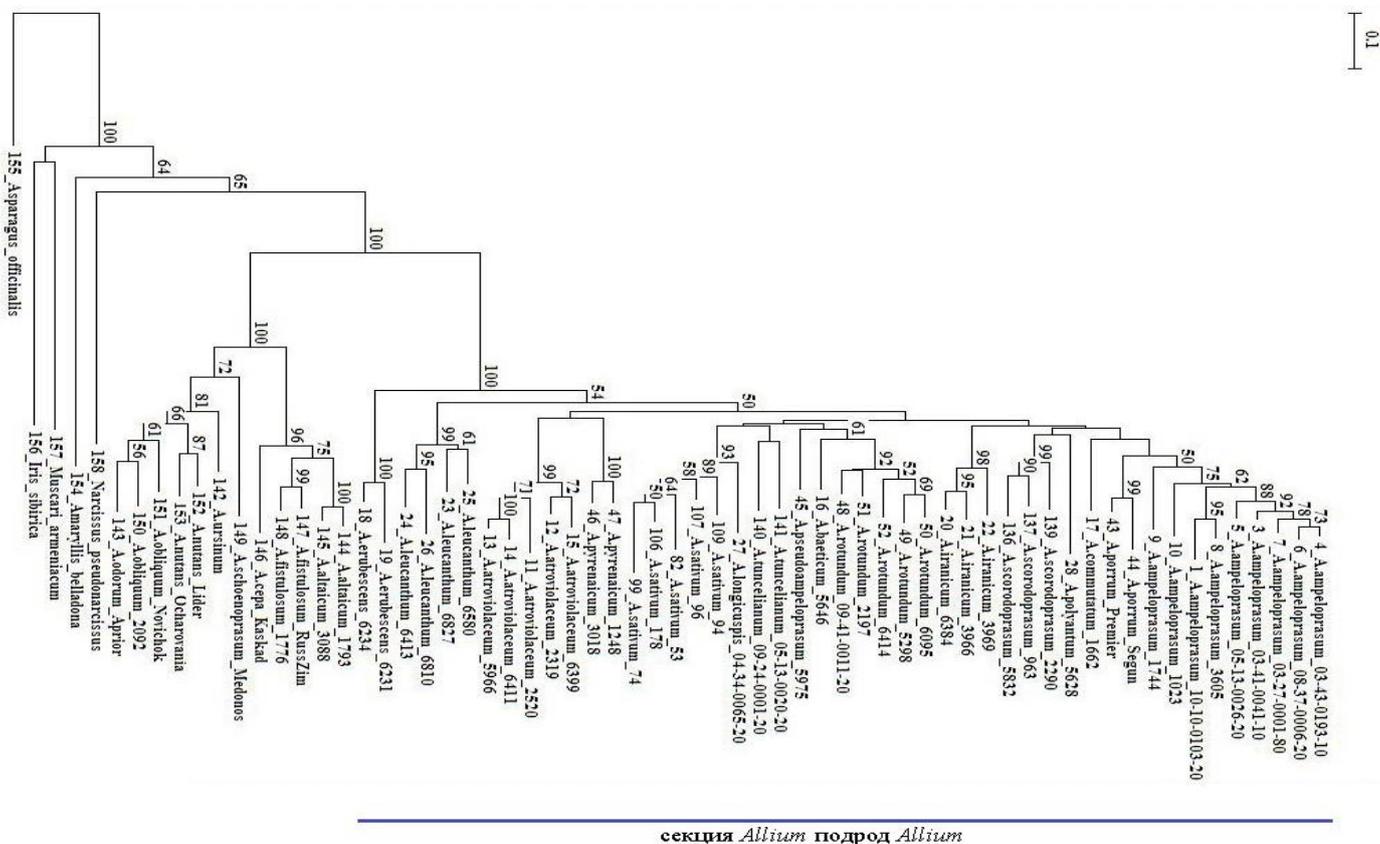


Рисунок 5. Дендрограмма генетических различий исследуемых образцов секции *Allium* по результатам AFLP-анализа (метод NJ).

Анализ некодирующих нуклеотидных последовательностей генома у видов секции *Allium*. Для уточнения филогенетических отношений между видами секции *Allium* на расширенной выборке, включающей 57 образцов 16 видов секции *Allium*, проведен анализ восьми некодирующих нуклеотидных последовательностей ядерного (ITS1-5.8S-ITS2), пластидного (спейсеры *rpl32-trnL*, *ndhJ-trnL*, *petN-psbM*, *trnC-petN*, *trnT-trnL* и интрон гена *rps16*) и митохондриального (b/c интрон гена *nad1*) геномов. Для многих исследуемых образцов эти участки определены и проанализированы впервые. Суммарная длина проанализированных для каждого образца последовательностей варьировала от 7249 п.н. (*A. tuncelianum*) до 7493 п.н. (*A. longicuspis*).

Всего по результатам анализа идентифицировано 620 SNPs. Наиболее полиморфными оказались ядерные ITS-спейсеры (126 SNPs; 19,6%) и пластидные спейсеры *rpl32-trnL* (134 SNPs; 12,4%) и *trnT-trnL* (102 SNPs; 9,6%), которые могут быть рекомендованы для филогенетических, таксономических и популяционных исследований рода *Allium*. У исследуемых видов были выявлены видоспецифичные замены и индели. Помимо этого, были идентифицированы SNPs и индели, характерные для групп образцов.

Проведенный филогенетический анализ на основе данных вариабельности некодирующих последовательностей ядерного и цитоплазматических геномов подтвердил таксономический статус большинства исследуемых видов. Образцы секции *Allium* формировали единый полиморфный кластер (ИБ=100), базальную ветвь к которому занял *A. odorum* (секция *Butomissa*) (рис. 6). Отдельные видовые субкластеры с высокой поддержкой формировали только виды *A. atroviolaceum*, *A. tuncelianum* и *A. leucanthum* (за исключением одного образца), остальные виды образовали смешанные субкластеры. Это подтверждает существующее мнение о сложности филогении и таксономии секции *Allium*, что связано с межвидовой гибридизацией и возникновением аллополиплоидов (Hanelt, 1996; Mathew, 1996; Peruzzi et al., 2016).

Виды *A. ampeloprasum*, *A. commutatum*, *A. porrum*, *A. polyanthum* и *A. pyrenaicum*, составляющие *Allium ampeloprasum complex* (Hirschegger et al., 2010), формировали отдельный субкластер (ИБ=75) (рис. 6). В то же время, по результатам AFLP-анализа данные виды, за исключением *A. ampeloprasum* и *A. porrum*, оказались разобщены на дендрограмме (рис. 5). Результаты анализа некодирующих последовательностей, в частности пластидного генома, свидетельствуют о тесном родстве видов *Allium ampeloprasum complex*, что позволяет предположить наличие общего предка-донора пластидного генома. Интересно отметить положение на дендрограмме образцов *A. porrum*, которые оказались в одном субкластере с видами *A. polyanthum* и *A. pyrenaicum*, а также двумя образцами *A. ampeloprasum* из Турции, в то время как остальные образцы *A. ampeloprasum* кластеризуются отдельно (рис.6).

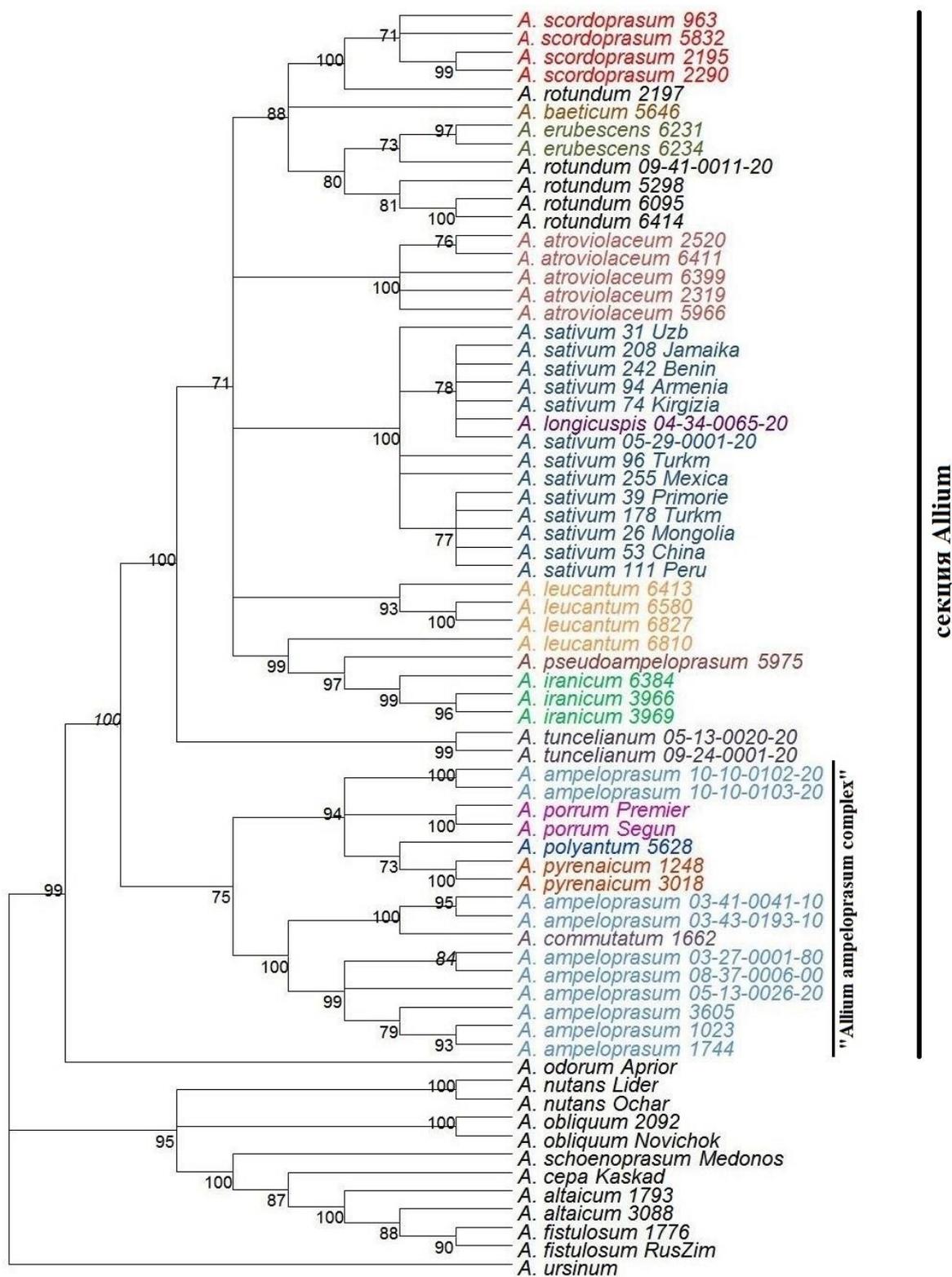


Рисунок 6. Дендрограмма, построенная на основе последовательностей 8 некодирующих участков ядерного, пластидного и митохондриального геномов (метод ML, модель K2+G+I).

Образцы *A. porrum* и *A. ampeloprasum* и на AFLP-дендрограмме (рис.5), и на дендрограмме, построенной по нуклеотидным последовательностям, образуют близкие, но отдельные субкластеры, что может указывать на роль именно *A. ampeloprasum* в образовании лука-порея. Hirschegger с соавт. (2010) на основе анализа последовательности двух

пластидных спейсеров не выделяют *A. porrum* в отдельный вид, а относят к группе тетраплоидных форм *A. ampeloprasum*. Однако наличие большого количества специфичных замен и инделей поддерживает выделение лука-порея в ранг отдельного вида, что совпадает с ранее предложенной классификацией (Friesen et al., 2006).

Проведенный анализ позволил определить положение *A. iranicum* и показал, вкуче с данными AFLP-анализа, что данный вид не родственен *A. ampeloprasum*, хотя и схож с ним по морфологическим признакам и считался его подвидом (Ghaffari, 2006). Образец *A. leucanthum* (6810) кластеризуется с образцами *A. iranicum*, формируя базальную ветвь, что, по-видимому, может указывать на его гибридное происхождение, так как эти виды имеют перекрывающийся ареал. В пользу этого говорит то, что по результатам AFLP-анализа данный образец формирует единый субкластер с остальными образцами своего вида, а по результатам анализа участков пластидного генома, этот образец имеет SNPs и индели, характерные для *A. iranicum*.

Также, показано филогенетическое родство видов *A. erubescens*, *A. rotundum*, *A. scorodoprasum* и *A. baeticum*, положение которого в секции *Allium* ранее было неизвестно.

Образцы *A. sativum*, аналогично результатам AFLP-анализа, формировали субкластер с *A. longicuspis* (рис. 6). Анализ нуклеотидных последовательностей не выявил различий между видами *A. sativum* и *A. longicuspis*, что поддерживает гипотезу о возможном происхождении чеснока от *A. longicuspis* вследствие возникновения мутаций в генах флорогенеза (Rotem et al., 2007, 2011). Образцы *A. tuncelianum*, который также считался возможным предком чеснока (Mathew, 1996), формировали, как и на AFLP дендрограмме (рис. 5), обособленный субкластер, достаточно удаленный от *A. sativum*, что не подтверждает его предковую роль в образовании *A. sativum*.

Анализ варибельности и вторичная структура гена 5.8S рРНК

Последовательность гена 5.8S считается довольно консервативной, и для многих родов растений не выявлено межвидовой варибельности этого гена (Xiao et al., 2010; Савельева и др., 2013). Для сравнительного анализа варибельности гена 5.8S рРНК у луков, помимо 57 образцов 16 видов секции *Allium*, были взяты представители других секций подрода *Allium*, а также шести подродов, относящихся к третьей эволюционной линии рода *Allium* (Friesen et al., 2006).

Длина последовательности гена 5.8S рРНК у всех взятых в анализ образцов составила 164 п.н., GC-состав варьировал от 49 до 52,6%. Была показана как межвидовая, так и внутривидовая варибельность последовательности 5.8S у представителей *Allium*. Было выявлено 36 варибельных сайтов, из которых 26 парсимони-информативных. Нуклеотидные замены у анализируемых образцов *Allium* локализованы преимущественно на 3'-конце гена. У большинства исследуемых образцов секции *Allium* последовательность 5.8S полностью

идентична последовательности *A. sativum*, за исключением видов *A. pyrenaicum* и *A. tuncelianum*, у которых было выявлено по одной замене, а также образцов *A. ampeloprasum* из Турции, которые характеризовались наличием специфической замены, отсутствующей у других образцов данного вида.

С помощью программы mFold была построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК *A. sativum* (рис. 7).

У всех исследованных образцов в гене 5.8S были идентифицированы три консервативных мотива: CGATGAAGAACGTAGC (16 п.н.), GAATTGCAGAATCC (14 п.н.) и TTTGAAUGCA (10 п.н.), характерные высшим растениям (Harpke and Peterson, 2008).

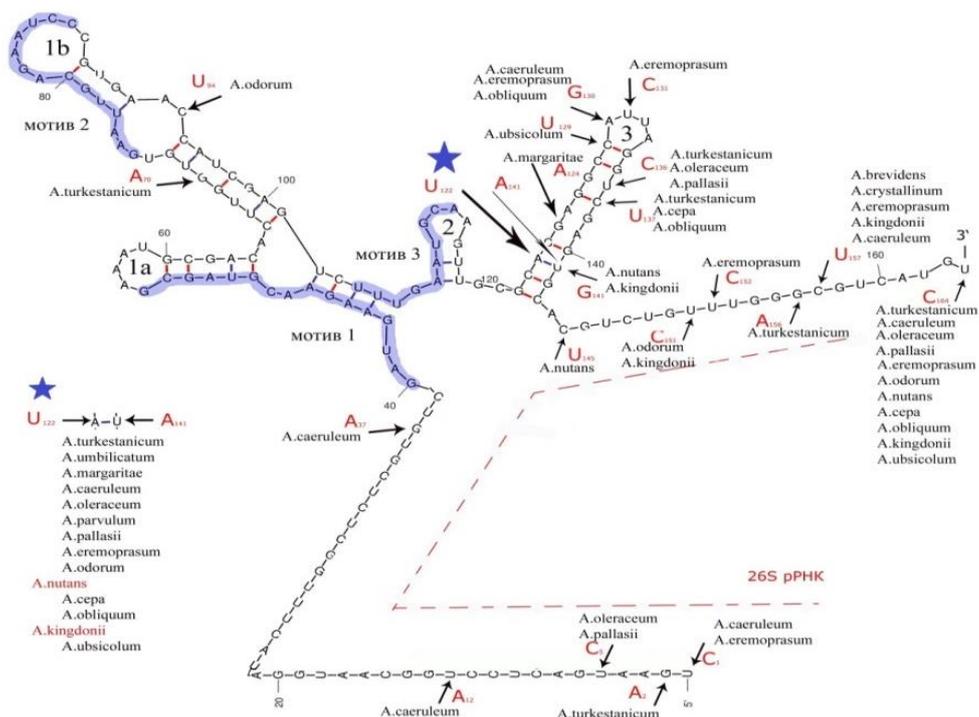


Рисунок 7. Вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у исследуемых образцов рода *Allium* (выделением указаны консервативные мотивы, стрелками отмечены нуклеотидные замены),

В целом топология вторичной структуры 5.8S рРНК у представителей *Allium* аналогична предложенной и описанной ранее для разных групп растений (Носов и Родионов, 2008; Xiao et al., 2010; Queiroz et al., 2011; Hodac et al., 2014). Выявленные нуклеотидные замены локализуются в районе третьей шпильки, однако при этом вторичная структура этой шпильки не меняется и поддерживается пятью-семью GC-парами.

Секвенирование пластидного генома *Allium sativum*

Впервые была установлена полная нуклеотидная последовательность пластидного генома чеснока *A. sativum*, его размер составил 153 172 п.н и состоит из большой (LSC, 82 035 п.н.) и малой (SSC, 18 015 п.н.) уникальных копий, разделенных двумя инвертированными повторами (IRa и IRb) длиной 26 561 п.н. каждый (рис. 8). Последовательность пластома была депонирована в NCBI под номером KX683282.

В последовательности пластома аннотировано 128 генов, из них 82 - белок-кодирующие, 38 тРНК, 8 рРНК, а также 6 псевдогенов. Большинство генов в пластидном геноме *A. sativum* монокопийные. Ген *trnM-CAU* и 18 генов в IRs представлены двумя копиями. Интронные последовательности содержат 15 генов, из них 13 (*atpF*, *rpoC1*, *trnL-UAA*, *trnV-UAC*, *ndhA*; четыре гена в IRs: *rpl2*, *ndhB*, *trnI-GAU*, *trnA-UGC*) содержат один интрон, а два (*clpP* и *ycf3*) - два интрона. Шесть генов являются псевдогенами, так как содержат либо внутренний стоп-кодон (*rps2*, *rps16*, *infA*, два *ycf15* в IRs), либо образованы в результате неполной дупликации (*ycf1*).

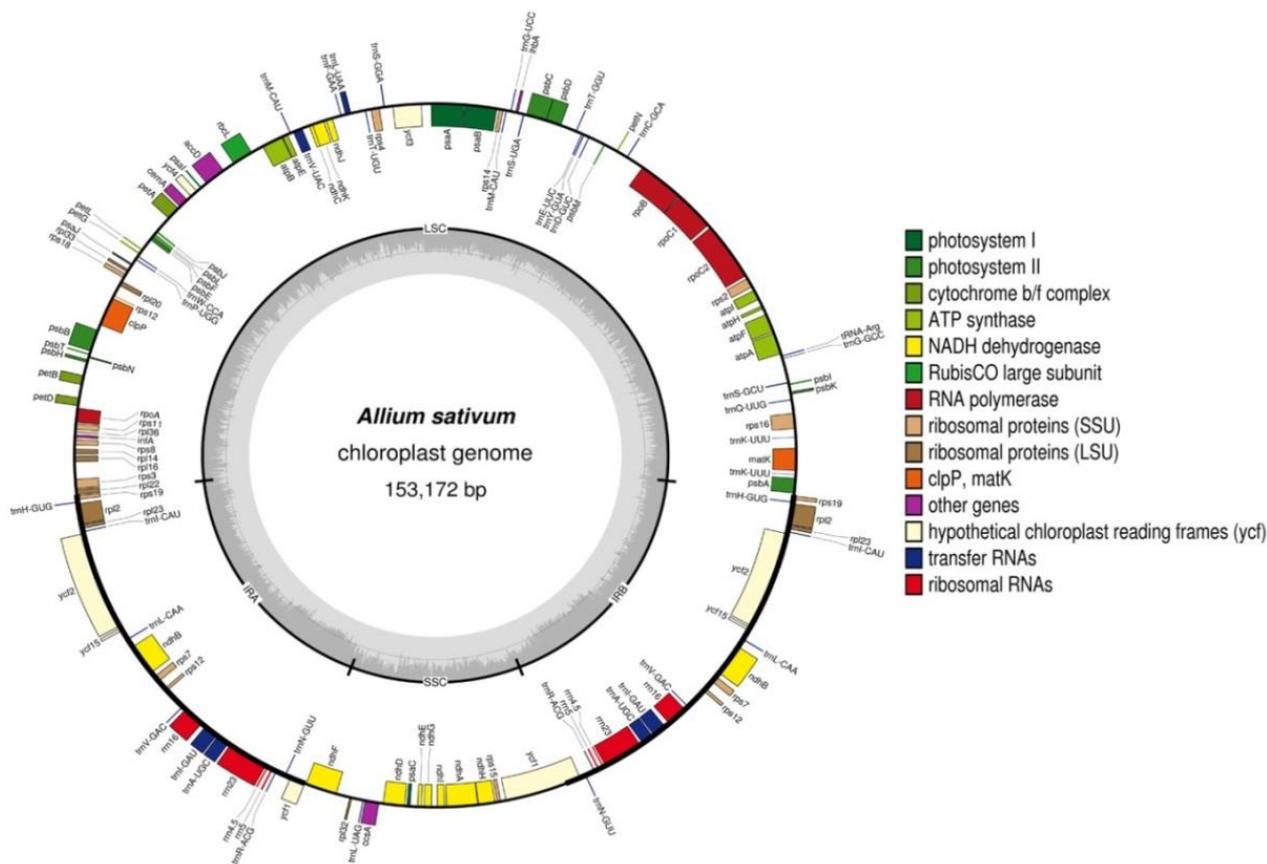


Рисунок 8. Генетическая карта пластидного генома *A. sativum*

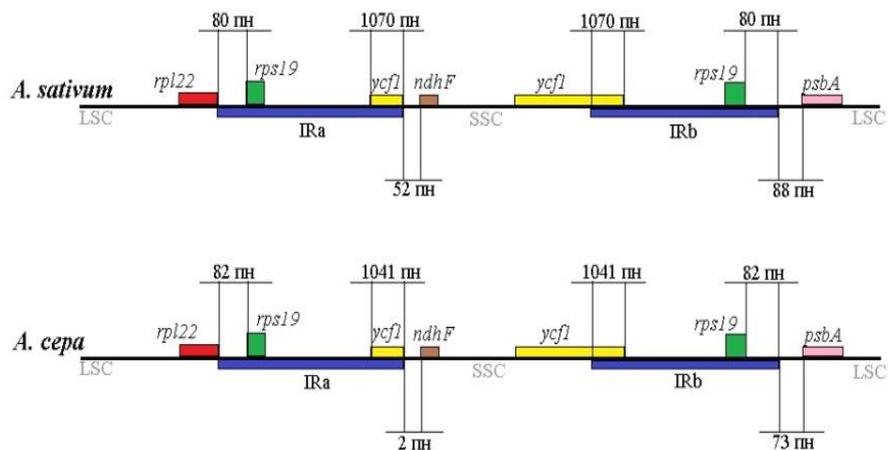


Рисунок 9. Границы инвертированных повторов в пластомах *A. sativum* и *A. cepa* (KF728079)

Сравнительный анализ пластомов *A. sativum* и *A. cepa* выявил различия, как по общей длине последовательности, так и по размеру структурных элементов. У *A. sativum*, относительно последовательности *A. cepa*, выявлено семь протяженных делеций в межгенных спейсерах. Сравнимые геномы отличались по числу белок-кодирующих генов, так как ген *rpl22* у *A. cepa* стал псевдогеном, а также длиной спейсеров на границах инвертированных повторов (рис. 9).

Идентификация генов холодового шока у видов родов *Allium* и *Brassica*

CSP-гены у видов рода *Allium*. У *A. sativum*, *A. cepa*, *A. longicuspis* и *A. tuncelianum* впервые были идентифицированы три гена (*CSP1*, *CSP2* и *CSP3*), кодирующие белки холодового шока. В белковых последовательностях были идентифицированы домен холодового шока (CSD), содержащий сайты связывания RNP1 и RNP2, а также мотивы цинковых пальцев CCHC-типа, число которых составляет в белке *CSP1* восемь, в *CSP2* – шесть, в *CSP3* – два.

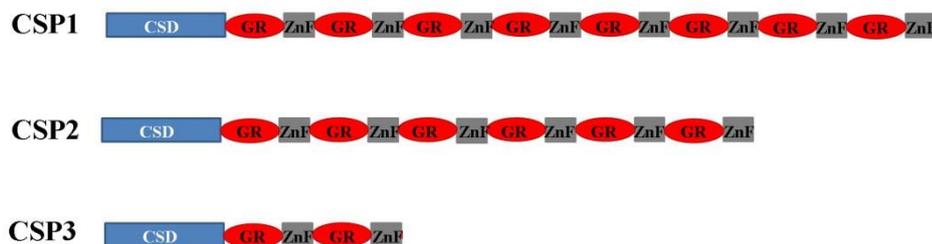


Рисунок 10. Структура идентифицированных белков холодового шока у видов *Allium*

У исследуемых образцов луков выявлено по несколько копий каждого из CSP-генов, которые отличаются друг от друга рядом нуклеотидных замен, а также, как, например *CSP3* у *A. sativum*, могут значительно отличаться длиной кодирующей последовательности. Одна из копий CSP-генов у *A. longicuspis*, *A. tuncelianum* и *A. cepa* оказалась псевдогеном, так как содержала в домене (*AtCSP3*) или в цинковых пальцах (*AtCSP1* и *AcCSP2*) нуклеотидную замену, приводящую к возникновению стоп-кодона. Анализ белков холодового шока показал, что разница в длине кодирующих последовательностей приводит только к изменению длин глицин-богатых областей на С-концах домена и цинковых пальцев.

CSP-гены у видов рода *Brassica*. Для проведения сравнительного анализа были идентифицированы гены холодового шока у двух видов рода *Brassica* – *B. napus* (рапс) и *B. rapa* (репа). У *B. napus* и *B. rapa* были определены нуклеотидные последовательности четырех генов (*CSP1*, *CSP2*, *CSP3* и *CSP4*). В белковых продуктах идентифицированных последовательностей были определены домен холодового шока и мотивы цинковых пальцев. Несмотря на то, что пары генов *CSP1/CSP3* и *CSP2/CSP4* кодируют белки с одинаковым числом цинковых пальцев, они отличаются по длине домена холодового шока и глицин-богатых С-концевых мотивов в домене и цинковых пальцах, а также по аминокислотному составу домена.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков холодового шока у *A. cepa* и *A. sativum* с таковыми у *B. rapa*, *B. napus* и *A. thaliana* показал, что белки с бóльшим числом цинковых пальцев имеют короткую глицин-богатую область на С-конце домена и первого цинкового пальца, а белки с двумя цинковыми пальцами имеют протяженные глицин-богатые области. Также, на примере AsCSP1 впервые для растений показано наличие белков холодового шока с восемью цинковыми пальцами, в то время как ранее считалось, что у растений они могут содержать не более семи цинковых пальцев, а у однодольных - не более четырех (Sasaki and Imai, 2012).

Анализ экспрессии генов холодового шока в вегетативных органах *A. sativum*

Анализ экспрессии генов *AsCSP1*, *AsCSP2* и *AsCSP3* методом RT-PCR позволил определить паттерны экспрессии каждого из генов в вегетативных органах (корень, донце, луковица, лист) *A. sativum* при нормальных температурных условиях и при обработке холодом (+4°C) в течение 12, 24 и 48 ч (рис. 11). Было показано, что при нормальных температурах *CSP*-гены в органах чеснока экспрессируются постоянно, но на низком уровне. Из трех генов, наибольший уровень экспрессии отмечен для *AsCSP3*, который в среднем более чем в 10 раз превышал экспрессию генов *AsCSP1* и *AsCSP2*.

Минимальный уровень экспрессии *CSP*-генов наблюдался в луковице и листьях, что может быть связано с наличием у *A. sativum* других механизмов защиты этих органов от холода. В корнях уровень экспрессии всех трех *CSP*-генов значительно снижался после холодной обработки. Аналогичное снижение уровня экспрессии *CSP*-генов в корнях после холодной обработки показано для риса (Chaikam and Karlson, 2008). Донце (видоизмененный стебель) было единственным органом, для которого отмечалось увеличение уровня экспрессии всех трех *CSP*-генов после 24-часовой обработки холодом, при этом уровень экспрессии гена *AsCSP3* возрастал в три раза по сравнению с экспрессией при отсутствии холодового стресса.

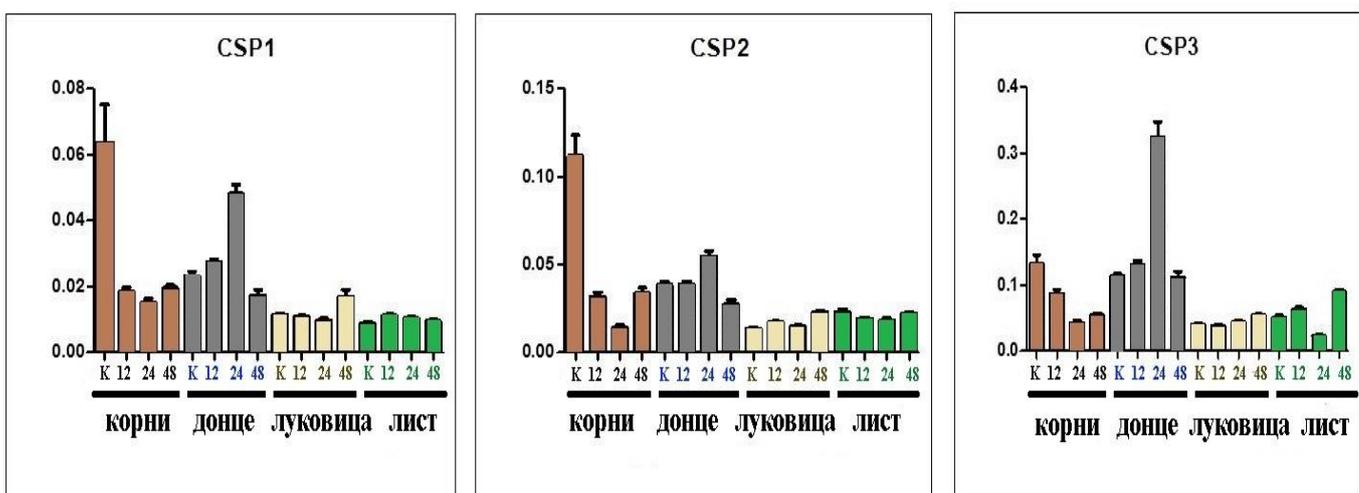


Рисунок 11. Анализ экспрессии генов *AsCSP1*, *AsCSP2* и *AsCSP3* в органах чеснока в нормальных температурных условиях и при холодном стрессе (12, 24 и 48 часов) методом qRT-PCR

Выводы

1. Анализ 80 образцов чеснока *A. sativum* различного эколого-географического происхождения с использованием методов AFLP и NBS-профайлинга выявил высокий уровень полиморфизма генома чеснока ($GD = 0,06-0,72$) и семейства генов устойчивости ($GD = 0,10-0,68$). Проведенный кластерный анализ не выявил зависимости разделения образцов *A. sativum* на группы от происхождения исследуемых образцов.
2. Анализ полиморфизма генома 16 сортов и гибридов лука-порея *A. porrum* методами AFLP и NBS-профайлинга показал, что уровни генетических расстояний между изученными образцами варьировали в пределах 0,11-0,32 и 0,01-0,20, что значительно ниже уровня геномного полиморфизма и вариабельности семейства R-генов у вегетативно размножаемого *A. sativum*.
3. Методом AFLP проведен анализ межвидового полиморфизма генома 59 образцов 24 видов 6 секций рода *Allium*. Генетические расстояния между видами секции *Allium* варьировали от 0,22 до 0,71, а между видами секции *Allium* и видами луков из других секций – от 0,76 до 0,93.
4. Анализ восьми нуклеотидных некодирующих последовательностей ядерного и цитоплазматических геномов позволил выявить возможные филогенетические отношения между видами секции *Allium* и определить видовой статус *A. porrum* и *A. iranicum*. Показано, что виды *Allium ampeloprasum complex* могут иметь общего предка-донора пластидного генома.
5. Определена полная нуклеотидная последовательность пластидного генома чеснока *A. sativum*. Размер пластома составил 153172 п. н. Всего в геноме идентифицировано 128 генов, из них 82 - белок-кодирующие, 38 - тРНК, 8 - рРНК, а также 6 псевдогенов. У *A. sativum* ген *rpl22* является полноразмерным, в то время как у *A. cepa rpl22* - псевдоген.
6. У *A. sativum*, *A. longicuspis*, *A. tuncelianum* и *A. cepa* были идентифицированы и охарактеризованы гены, кодирующие белки с доменом холодового шока (*CSP1*, *CSP2* и *CSP3*). Впервые показано наличие у растений белков холодового шока с восемью цинковыми пальцами. Сравнительный анализ последовательностей белков холодового шока у *Allium* (*A. cepa* и *A. sativum*) и Brassiaceae (*B. rapa* и *A. thaliana*), показал, что белки с большим числом цинковых пальцев (6-8) имеют короткую глицин-богатую область на С-конце домена холодового шока и первого цинкового пальца, в то время как у белков с двумя цинковыми пальцами эти области более протяженные.
7. Анализ экспрессии генов *AsCSP1*, *AsCSP2* и *AsCSP3* в вегетативных органах чеснока при нормальных температурных условиях и при холодовом стрессе показал, что уровень экспрессии гена *AsCSP3* выше, чем у двух других генов. Под действием холода (+4⁰C) уровень экспрессии *AsCSP*-генов возрастает только в донце; максимальное увеличение экспрессии (в 3 раза) было показано для *AsCSP3* при 24-часовом холодовом стрессе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Филюшин, М.А.** Анализ вариабельности гена 5.8S рРНК у представителей третьей эволюционной группы рода *Allium* / М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева // Генетика. –2014. –Т. 50. – №10. – С.1263-1268.
2. Рыжова, Н.Н. Идентификация и анализ нуклеотидного полиморфизма генов *Brassica rapa* (репа), кодирующих белки с доменом холодового шока (CSDP) / Н.Н. Рыжова, **М.А. Филюшин**, А.М. Артемьева, М.В. Бердникова, В.В. Таранов, А.В. Бабаков, Е.З. Кочиева // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – №1. – С. 107-115.
3. **Филюшин, М.А.** AFLP маркирование сортов лука-порея (*Allium porrum*) / М.А. Филюшин, О.А. Холда, Е.З. Кочиева, Н.Н. Рыжова // Генетика. – 2011.– Т. 47. – №4.– С. 560-565.

Публикации в других изданиях и тезисы конференций:

1. **Filyushin, M.A.** The complete plastid genome sequence of garlic *Allium sativum* L. / М.А. Filyushin, A.V. Beletsky, A.M. Mazur, E.Z. Kochieva // Mitochondrial DNA. Part B Resources. – 2016. – V1. – №1. – P. 831-832.
2. **Филюшин, М.А.** Вариабельность генома чеснока *Allium sativum* из популяций исторического центра происхождения и современного ареала распространения вида/ М.А. Филюшин // Материалы конференции "Жизнь во вторичном ареале" (ГБС им. Н.В. Цицина, Москва, 2016г.) опубликованы в журнале Skvortsovia. – 2017. –V. 3. – №2. – С.66.
3. **Filyushin, M.A.** Plastid genome polymorphism in *Allium sativum* accessions of different ecological and geographical origin / М.А. Filyushin, K.V. Boris // Материалы Международного научного симпозиума «Генетика и геномика растений для продовольственной безопасности». – Новосибирск. – 2016.– С. 18.
4. **Filyushin, M.A.** AFLP-analysis of section *Allium* species genome polymorphism / М.А. Filyushin // Сборник VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». – Ялта. – 2016. – С. 198.
5. **Филюшин, М.А.** Анализ вариабельности ядерного транскрибируемого спейсера ITS1-5.8S-ITS2 у представителей рода *Allium* / М.А. Филюшин // Сборник тезисов VI Съезда ВОГиС.– Ростов-на-Дону. –2014.– С. 20.
6. **Filushin, M.A.** Identification and nucleotide polymorphism in *Brassica rapa* genes cold shock domain proteins /М.А. Filushin, N.N. Ryzhova, E.Z. Kochieva // Материалы III международной конференции «Molecular Phylogenetics MolPhy-3». – Москва. – 2012. – С.150.