

на правах рукописи

Брюхин Владимир Борисович

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛОВОГО
РАЗМНОЖЕНИЯ И АПОМИКСИСА У ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ
РАСТЕНИЙ**

1.5.3. Молекулярная биология, биологические науки

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:
член-корр. РАН, профессор
доктор биологических наук
Алексей Петрович Рысков

Санкт-Петербург

2023

Содержание

Введение.....	9
Актуальность и разработанность темы исследования.....	9
Цель исследования.....	11
Задачи.....	11
Научная новизна.....	12
Теоретическая и практическая значимость работы.....	15
Методология и методы исследования.....	16
Положения, выносимые на защиту.....	17
Степень достоверности и апробация результатов.....	18
Личный вклад автора в проведение исследования.....	18
Апробация работы.....	19
Публикации.....	21
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	22
Структура и объем работы.....	22
Благодарности.....	22
Конкурсная поддержка работы.....	23
Глава 1. Половое и бесполое размножение посредством семян.....	24
1.1 Особенности полового размножения растений.....	26
1.2 Эволюция и развитие женского гаметофита (зародышевого мешка)	28
1.3 Структурное разнообразие женских гаметофитов покрытосеменных.....	32
1.4 Гаметофитный апомиксис и его значение для сельского хозяйства.....	36

Глава 2. Молекулярно-генетическая регуляция развития женского гаметофита.....	43
2.1 Развитие женского гаметофита покрытосемянных.....	43
2.1.1 Мегаспорогенез.....	44
2.1.2 Мегегаметогенез.....	46
2.1.3 Двойное оплодотворение.....	46
2.1.4 Начало эндоспермогенеза и эмбриогенеза.....	47
2.2 Развитие пыльника и мужского гаметофита.....	48
2.3 Идентификация генов, влияющих на развитие гаметофита.....	50
2.3.1 Инсерционный мутагенез для получения мутантных линий, влияющих на репродукцию растений.....	53
2.3.2 Двухступенчатый скрининг, направленный на изоляцию гаметофитных и эмбриолетальных мутантов.....	56
2.3.3 Анализ эффективности генетической передачи (трансмиссионный анализ)	68
2.3.4 Определение количества <i>Ds</i> -элементов в геноме каждой мутантной линии	71
2.3.5 Идентификация фланкирующих встроенный <i>Ds</i> -элемент последовательностей и анализ инсерционных линий из других коллекций.....	72
2.3.6 Анализ фенотипа пыльцы (мужских гаметофитов) у исследуемых мутантов.....	79
2.3.7 Гаметофитные мутации демонстрируют плеiotропные эффекты при остановке развития гаметофита.....	81
2.3.8 Гаметофитные мутации часто связаны с хромосомными перестройками.....	83
 Глава 3. Молекулярно-генетическая регуляция эмбриогенеза растений.	85

Глава 4. Влияние и регуляторная функция убиквитинового метаболизма на развитие женского гаметофита и эмбриогенез растений.....	92
4.1 Убиквитин-протеасомный метаболический путь и его связь с эмбриогенезом.....	92
4.1.1 Субъединица RPN1 протеасомы 26S играет важную роль в эмбриогенезе у арабидопсиса. Геном <i>Arabidopsis thaliana</i> содержит два гена <i>RPN1</i>	95
4.1.2 Характеристика мутантов с инсерциями транспозонов в генах <i>RPN1a</i> и <i>RPN1b</i>	97
4.1.3 Нарушение гена <i>RPN1a</i> вызывает зиготическую эмбриолетальность.....	99
4.1.4 Зародыши, гомозиготные по мутациям в <i>RPN1a</i> останавливают свое развитие на глобулярной стадии.....	103
4.1.5 У мутантных зародышей <i>rpn1a</i> наблюдались дефекты прогрессии клеточного цикла.....	106
4.1.6 Гены <i>RPN1</i> экспрессируются как в вегетативных, так и репродуктивных органах.....	107
4.1.7 Гены <i>RPN1a</i> и <i>RPN1b</i> не имеют дублирующих функций....	113
4.1.8 Две изоформы <i>RPN1</i> функционально эквивалентны.....	116
4.2 Выводы.....	118
4.2.1 Для нормального эмбриогенеза необходим <i>RPN1a</i> , но не <i>RPN1b</i>	120
4.2.2 Нарушение убиквитинирования белка, но не функции <i>RPN1</i> , вызывает аномалии гаметогенеза.....	123
4.2.3 <i>RPN1a</i> и <i>RPN1b</i> функционально эквивалентны, но во время репродуктивного развития их действие не является избыточным.....	124
4.3 Значение и функция куллинов для убиквитин - 26S-протеасомного пути. Гены <i>CUL3A</i> и <i>CUL3B</i> арабидопсиса необходимы для нормального эмбриогенеза.....	126

4.3.1 У мутанта с потерей функции <i>cul3b</i> не наблюдается морфологических дефектов.....	128
4.3.2 В репродуктивных органах и во время эмбриогенеза <i>CUL3a</i> и <i>CUL3b</i> экспрессируются перекрывающимися паттернами.....	132
4.3.3 Нарушение генов <i>CUL3a</i> и <i>CUL3b</i> снижает гаметофитную передачу и вызывает материнский эффект гибели зародышей.....	135
4.3.4 Потеря функции <i>CUL3</i> влияет на формирование паттерна зародыша арабидопсиса и на развитие эндосперма.....	140
4.3.5 Двойные мутанты <i>cul3a-1 cul3b-1</i> завершают эмбриогенез, но вскоре после прорастания проростки останавливают свой рост.....	142
4.4 Выводы.....	143
4.4.1 Мутанты арабидопсиса <i>cul3a-1 cul3b-1</i> останавливают свое развитие на нескольких стадиях эмбриогенеза.....	143
4.4.2 Играет ли <i>CUL3</i> роль в контроле клеточного цикла?.....	145
4.4.3 Все ли растительные E3 лигазы на основе <i>CUL</i> регулируют биосинтез фитогормонов и/или передачу сигналов?.....	146
4.5 Роль E3 лигаз, содержащих CUL4 (CRL4s). Комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с MSI1 и является необходимым для поддержания родительского импринтинга гена <i>MEDEA</i>	147
4.5.1 MSI-подобные белки представляют собой эволюционно консервативные белки WD40, которые содержат мотивы WDxR	150
4.5.2 MSI1 у арабидопсиса ассоциируется с DDB1A и CUL4.....	152
4.5.3 CUL4 и его адаптеры DDB1A и DDB1B необходимы для нормального протекания эмбриогенеза.....	155
4.5.4 <i>CUL4</i> экспрессируется во время эмбриогенеза.....	164
4.6 Значение комплексов на основе CUL4 для поддержания родительского импринтинга гена <i>MEDEA</i>	166
4.6.1 У мутантов <i>cul4</i> теряется импринтирование экспрессии <i>MEA</i>	166

4.6.2 При дефиците CUL4 в семенах накапливаются транскрипт и белок MEA.....	174
4.7 Выводы.....	175
Глава 5. Нарушение функции экзосом способствует возникновению гаметофитного и эмбриолетального фенотипов и аномалий развития растений.....	
5.1 Состав внутреннего контура экзосомы арабидопсиса.....	182
5.2 Мутации в коровых субъединицах экзосом арабидопсиса вызывают уникальные фенотипы.....	185
5.3 Глобальный анализ мишеней экзосом арабидопсиса высокого разрешения.....	193
5.4 РНК-мишени экзосомы арабидопсиса.....	201
5.4.1 Стабильные структурные РНК.....	201
5.4.2 РНК, ассоциированные с гетерохроматическими повторами, и новые некодирующие РНК.....	203
5.5 Выводы.....	205
Глава 6. Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса и использование геномных технологий для его исследования.....	
6.1 Гены, потенциально ассоциированные с апомиксисом.....	209
6.2 Растения из рода <i>Boechnera</i> как ресурс для исследования апомиксиса.....	213
6.2.1 Таксономия и местообитания наиболее важных видов <i>Boechnera</i>	214
6.2.2 Преимущества рода <i>Boechnera</i> для изучения апомиксиса.....	218
6.2.3 Цитоэмбриологические и проточно цитометрические исследования <i>Boechnera</i>	219
6.2.4 Популяционно-генетические исследования рода	

<i>Boechnera</i> в отношении апомиксиса.....	229
6.2.5 Наследование и генетические аспекты апомиксиса у представителей рода <i>Boechnera</i>	234
6.3 Анализ экспрессии ассоциированных с апомиксисом генов <i>CENH3</i> и <i>APOLLO</i> у половых и апомиктических видов <i>Boechnera</i> ..	242
6.3.1 Характеристики гена <i>CENH3</i> и изоформ его белка....	244
6.3.2 Характеристика промотора гена <i>CENH3</i>	247
6.3.3 Экспрессия <i>CENH3</i> во время и после (апо) мейоза в гинецеях, стручках и пыльниках.....	249
6.3.4 Экспрессия <i>APOLLO</i> во время и после (апо)мейоза в гинецеях, стручках и пыльниках.....	251
6.3.5 Анализ сходства <i>APOLLO</i> у видов <i>Brassicaceae</i>	254
6.3.6 Обсуждение и выводы.....	255
6.4 Молекулярные инструменты для изучения растений из рода <i>Boechnera</i> : трансформация, микродиссекция с лазерным захватом и транскриптомика.....	259
6.5 Ресурсы для геномных исследований рода <i>Boechnera</i> и проблемы анализа генома.....	263
6.6 Сборка генома <i>Boechnera retrofracta</i>	273
6.6.1 Статистика на основе k-mer анализа.....	274
6.6.2 Сборка и оценка генома.....	275
6.6.3 Аннотация повторов, поиск вариантов и генотипирование.....	276
6.6.4 Предсказание белок кодирующих генов и нкРНК.....	278
6.6.5 Реконструкция дерева видов.....	278
6.6.6 Полногеномное сравнение.....	279
6.6.7 Обсуждение и выводы.....	280
6.7 Сборка высоко гетерозиготного генома и хромосомный анализ апомиктического растения <i>Boechnera</i>	283

Глава 7. Эпигенетические модификации при размножении и развитии растений.....	288
7.1 Эпигенетические системы у растений.....	288
7.2 Метилирование при развитии меристемы.....	291
7.3 Эпигенетическая регуляция микроспорогенеза и развития мужского гаметофита.....	294
7.4 Эпигенетическая регуляция мегаспорогенеза и развития женского гаметофита.....	296
7.5 Роль эпигенетических изменений при оплодотворении, эмбриогенезе и эндоспермогенезе. Импринтированные гены.....	297
7.6 Эпигенетическое наследование последующими поколениями. Апомиктическое и бесполое размножение.....	299
Экспериментальные процедуры.....	307
Заключение.....	346
Выводы	354
Список сокращений.....	357
Список литературы.....	361

Введение

Актуальность и разработанность темы исследования

Одной из базовых концепций общей и эволюционной биологии является представление о том, что все живые организмы происходят от ранее существовавших организмов. Таким образом, размножение является необходимым условием онтогенеза и филогенеза живых существ, а следовательно, и их эволюции. В процессе последней высшие растения приобрели ряд универсальных стратегий, способствующих репродуктивному успеху. У цветковых растений жизненный цикл представляет собой чередование двух гетероморфных поколений, диплоидного спорофита и гаплоидного гаметофита. В отличие от животных организмов генеративные линии цветковых растений не образуют напрямую женские и мужские гаметы (половые клетки). Вместо этого соматические клетки спорофита проходят два деления мейоза, продуктами которого являются гаплоидные материнские споровые клетки, из которых в процессе гаметогенеза формируются многоклеточные гаметофиты, женский (зародышевый мешок) и мужской (пыльца), в специализированных генеративных органах, семязачатке и пыльнике соответственно. Женский гаметофит содержит женские гаметы, яйцеклетку и центральную клетку, тогда как мужской гаметофит включает в себя мужские гаметы, спермии (Brukhin, Morozova, 2011; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017; Brukhin et al., 2019). При половом размножении, в результате двойного оплодотворения происходит слияние одного спермия с яйцеклеткой, а второго с центральной клеткой, что дает начало диплоидному зародышу (новому поколению спорофита) и триплоидному эндосперму (терминальной питательной ткани для зародыша) (Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017). Кроме того, эндосперм очень важен с экономической точки зрения, поскольку он представляет собой основной компонент семян зерновых культур, поставляемых пищевой промышленностью, и является основной составляющей массы большинства зерновых культур, обеспечивающих питанием и энергией человека и животных. Можно сказать, что

эндосперм является основой питания двух третей населения Земли, прежде всего стран Азии, Африки и Южной Америки, важную основу рациона которых составляют рис, кукуруза и пшеница.

Помимо полового в природе довольно распространено бесполое размножение, при котором не происходит мейоз и отсутствует оплодотворение - вегетативное размножение и апомиксис. При вегетативном размножении новые растения образуются без формирования гамет и семян, тогда как при апомиксисе образуются семена, содержащие бесполоый зародыш, генетически идентичный материнскому растению (Брюхин, 2017; Brukhin, 2017; Brukhin et al., 2019). Апомиксис довольно распространён в природе, он встречается более чем у сотен видов растений, принадлежащих примерно к 148 родам (Hojsgaard et al., 2014). При этом он практически не обнаружен в культурных растениях.

Половое размножение и апомиксис имеют свои преимущества для выживания и расширения ареалов естественных популяций растений и для сельскохозяйственного применения. Половое размножение обеспечивает материал для формирования генетически и фенотипически изменчивого потомства, что способствует адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды и позволяет селекционерам выводить новые сорта культурных растений. Апомиксис же напротив формирует клональное потомство, генетически идентичное материнскому растению, тем самым позволяя фиксировать сложные генотипы, и сохранять комплексы ценных приобретенных признаков в неограниченном ряду поколений (Koltunow et al., 1995; Grossniklaus et al., 2002; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017). В последние десятилетия исследования полового и апомиктического размножения растений привлекло большое внимание многих ученых во всем мире. Такой интерес вызван следующими причинами: 1) переход спорофита к генеративной фазе, и изменение программ развития его соматических клеток на репродуктивный путь является важным событием жизненного цикла растений; 2) понимание генетических и молекулярных механизмов регуляции полового размножения и апомиксиса важнейшее условие фенотипического улучшения урожая и контролируемого управления семенной

репродукцией растений в агро секторе (Кашин, 1993; Koltunow et al., 1995; Vielle-Calzada et al., 1996; Grossniklaus et al., 2002; Spillane et al., 2004; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017; Elkonin et al., 2018; Соколов, Абдырахманова, 2019; Brukhin, Baskar, 2019; Брюхин, Андрусенко, 2021); 3) вслед за мейозом при половом размножении или апомейозом при апомиксисе из одной споры/апоспоры/диплоспоры соответственно, благодаря нескольким раундам митоза и последующей целлюляризации происходит образование гаметофитов, состоящих из небольшого количества функционально разных типов клеток. Изучение процесса формирования этих клеток и его молекулярных основ является крайне важным условием для решения фундаментальных вопросов биологии развития (Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017; Brukhin, 2017; Brukhin, Baskar, 2019); 4) инженерия апомиктических культур имеет большой потенциал и экономическую ценность для растениеводства. Внедрение апомиксиса в культурные растения и использование его свойств способствует значительному росту сельскохозяйственного производства, что может стать предвестником второй «зеленой революции» (Savidan, Dujardin 1992; Брюхин, 2017) или, как назвал ее Виелле Кальсада с соавторами, к «асексуальной революции» (Vielle Calzada et al., 1996).

Цель исследования

Изучение молекулярно-генетических аспектов регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений с использованием полногеномных технологий.

Исходя из поставленной цели были намечены следующие **задачи**:

1. С помощью системы транспозонов *Ac* и *Ds* и последующего двухступенчатого скрининга получить мутантные линии арабидопсиса с нарушением формирования женского гаметофита и эмбриогенеза, осуществить анализ полученных мутантов, выявить нарушенные гены.

2. Изучить влияние генов убиквитинового метаболизма *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*, *CUL3b* и комплекса лигазы E3 *CUL4-DDB1* на развитие женского гаметофита и эмбриогенез растений на модельном растении *Arabidopsis thaliana*.
3. Исследовать значение функции экзосом для формирования женского гаметофита, эмбриогенеза и развития проростков арабидопсиса.
4. Изучить и охарактеризовать гены *APOLLO* и *CENH3*, ассоциированные с апомиксисом, у половых и апомиктических видов *Boecheira*.
5. Осуществить сборку и произвести сравнительный анализ геномов половых и апомиктических растений из рода *Boecheira* как ресурса для исследования апомиксиса.
6. Проанализировать существующие данные о роли эпигенетических изменений при размножении и развитии растений.

Научная новизна исследования заключается в комплексном подходе к изучению базовых этапов размножения растений – мейоза, гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенеза, с использованием морфологических, молекулярно-генетических, цитогенетических и геномных методов и подходов.

1. С помощью инсерционного мутагенеза были произведены более двух с половиной тысяч мутантных линий модельного растения *Arabidopsis thaliana*, а также идентифицированы и проанализированы мутанты с нокаутом генов, влияющих на развитие гаметофитов и эмбриогенез. Проанализирована функция нарушенных генов и фенотип шести мутаций, ассоциированных с развитием женского гаметофита, изолированных из полученной коллекции мутантов (Brukhin et al., 2011).
2. Обнаружено, что при остановке развития гаметофита соответствующие мутации затрагивают многие важные процессы в клетке, а также, что эти мутации часто ассоциируются с хромосомными перестройками. Выявленные мутации влияют как на мужские, так и на женские гаметофиты, то есть полностью секс-специфичные гаметофитные мутации встречаются

редко, что вполне ожидаемо, поскольку многие процессы во время гаплоидной фазы при формировании мужского и женского гаметофитов сходны и необходима экспрессия множества генов (Brukhin et al., 2011).

3. Помимо зиготического эмбриолетального фенотипа, у *Arabidopsis thaliana* нами обнаружено четыре класса наиболее часто встречаемых дефектов женского гаметофита, выделенных согласно сценарию остановки его развития (Brukhin et al., 2005a): митотический, кариогамный, дегенеративный и материнского гаметофитного эффекта, ведущего к абортности семян. Несмотря на преобладающую стадию остановки развития, экспрессия фенотипа у многих мутантов обнаруживала вариабельность (Brukhin et al., 2011).
4. Подтверждено, что убиквитин-протеасомный метаболический путь, выполняющий функцию деградации регуляторных молекул в клетках, является крайне необходимым для гаметогенеза и эмбриогенеза у арабидопсиса.
5. Выявлена важная роль, которую выполняет субъединица RPN1 протеасомы 26S для нормального протекания эмбриогенеза и клеточного цикла. Для гена *RPN1* обнаружены два паралога, являющиеся функционально эквивалентными, но не избыточными в репродуктивном развитии *in planta* (Brukhin et al., 2005b).
6. Обнаружено, что ген куллин (CUL)-зависимой убиквитинлигазы *CUL3* представлен в геноме двумя копиями, проявляющими функциональную избыточность по отношению друг к другу; функциональное нарушение обеих копий гена *CUL3* снижает гаметофитную передачу и вызывает гибель образовавшихся зародышей; *CUL3* влияет на формирование паттерна зародыша арабидопсиса и на развитие эндосперма. Также обнаружено, что наблюдаемая абортность зародышей находится под материнским контролем (Thomann et al., 2005).
7. Установлено, что потеря функции комплекса CUL4-DDB1, важного класса куллинсодержащих убиквитинлигаз (E3), задействованного в развитии и

размножении растений и действующего как субстратный рецептор, приводит к гибели зародышей в семенах арабидопсиса. Наши исследования предоставили первые доказательства физической и функциональной связи между лигазой CRL4 E3 и комплексом PRC2, что указывает на новую роль убиквитинирования в подавлении экспрессии генов (Dumbliauskas et al., 2011).

8. С помощью генетического, протеомного и полнотранскриптомного анализа впервые представлены доказательства уникальной субфункционализации отдельных коровых субъединиц экзосомы растений и роли экзосомы в размножении и развитии на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Было обнаружено, что отдельные субъединицы экзосомы растений необходимы для развития женских гаметофитов (RRP41) или эмбриогенеза (RRP4), то есть являются существенными структурами для нормального семенного размножения (Chekanova et al., 2007).
9. Обобщены и проанализированы гены-кандидаты, связанные с возникновением апомиксиса (Брюхин, 2017; Brukhin, 2017; Brukhin, Baskar, 2019; Brukhin et al., 2019). Выполнен экспрессионный анализ ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* (кодирующий центромерный гистон H3) и *APOLLO* (кодирующий экзонуклеазу NEN3), выявлены различия в экспрессии этих генов у половых и апомиктических видов *Boechnera* (Bakin et al., 2022). Осуществлен филогенетический анализ гена *APOLLO*, обнаруживший разделение на две отдельные ветви апо- и половых аллелей гена. Предложен эволюционный сценарий, согласно которому одна из копий *APOLLO* могла приобрести новую функцию у общего предка видов *Boechnera*, что привело к выделению апомиктических линий (Kliver et al., 2018).
10. Подтверждено, что геномы апомиктических растений из рода *Boechnera* характеризуются высокой гетерозиготностью, сопровождающейся аллоплоидией и анеуплоидией, возникших в результате гибридизационных событий, тогда как половые виды имеют относительно гомозиготный геном

(Schranz et al., 2005; Koch et al., 2003; Mandáková et al., 2015; Kliver et al., 2018; Brukhin et al., 2019).

11. На нескольких платформах осуществлено полногеномное секвенирование полового вида *Boechea retrofracta* и апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta*.
12. Впервые выполнена безреференсная сборка генома полового вида *B. retrofracta* и поэтапная безреференсная сборка до уровня хромосом высоко гетерозиготного генома апомиктического растения, древнего природного гибрида половых растений *B. stricta* и *B. retrofracta*, у которого обнаружены дополнительные абберрантные хромосомы *Het* и *Del*, являющиеся наиболее вероятными кандидатами, несущими локусы генов, связанных с апомиксисом. Осуществлена аннотация собранных геномов.
13. Проанализирована роль эпигенетических изменений в репродуктивном развитии растений, которые имеют различное приспособительное значение при половом и бесполом размножении. (Brukhin, 2020; Brukhin, Albertini, 2021).

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены и проанализированы новые данные по молекулярно-генетической регуляции важных репродуктивных процессов растений, в том числе, относящихся к спорогенезу, мейозу, гаметогенезу, оплодотворению и эмбриогенезу. Проведенные исследования имеют фундаментальное значение для решения ведущих вопросов биологии развития.

Практическое значение работы заключается в том, что исследование семенного размножения и гаметофитного апомиксиса у покрытосеменных является важным ресурсом для интенсификации и повышения эффективности сельского хозяйства, а биоинженерное внедрение элементов апомиксиса в культурные растения позволит на длительный срок закрепить сложные генотипы, в том числе высоко гетрозиготные и полиплоидные генотипы, которые способствуют возникновению

гибридной силы при гетерозисе, а также созданию самоподдерживающихся популяций, устойчивых к вредителям и экстремальным факторам внешней среды. Полученные результаты диссертации дополняют знания о молекулярно-генетической регуляции, которые в итоге позволят подойти к целенаправленному управлению этими процессами, будут способствовать интенсивному развитию сельского хозяйства.

Результаты настоящего исследования могут быть использованы научными сотрудниками, преподавателями ВУЗов, включены в учебные пособия и учебники, а также в курсы лекций и практических занятий для студентов, специализирующихся в области молекулярной биологии, генетики развития и биологии растений.

Методология и методы исследования

Для исследований, представленных в диссертации, были выбраны адекватные методы и подходы молекулярно-генетического и мутационного анализа, реципрокных скрещиваний, фенотипического и сегрегационного анализа, молекулярной биологии, гибридизации *in situ*, цито-морфологии, микроскопии, цитогенетики, трансформации и реверсии мутаций, молекулярной филогенетики, секвенирования, NGS (полногеномное секвенирование на различных платформах, Illumina, ONT, Hi-C, Bionano Genomics, микрочипы и др.), биоинформатики, проточной цитометрии, масс-спектропии и др. Объектом исследования были растения *Arabidosis thaliana* дикого типа (wt) и мутантные растения с интересующими нас фенотипами; половые и апомиктические растения из рода *Boechera*. Предметом исследования являлись особенности полового и апомиктического размножения растений, молекулярно-генетические, цитологические и геномные различия, определяющие эти два типа размножения. Исследования проводились в лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН, Центре геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского СПбГУ и лаборатории генетики развития растений Цюрихского университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Гены, ответственные за гаметофитные мутации у *Arabidopsis thaliana* часто демонстрируют плейотропные эффекты, что выражалось в вариабельности фенотипа ряда мутантов, и принадлежат к различным семействам.
2. Убиквитин-протеасомный метаболический путь (с участием генов *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*, *CUL3b*, *CUL4*, *DDB1* и др.) растений регулирует размножение и развитие растений, в том числе, нормальный гаметогенез и эмбриогенез.
3. Комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*.
4. Экзосомы, играющие центральную роль в метаболизме РНК, являются важными белковыми комплексами клетки, принимающими участие в регуляции размножения и развития растений. Основные субъединицы растительной экзосомы демонстрируют высокий уровень функциональной пластичности и субфункционализации при гамето- и эмбриогенезе.
5. Гены *CENH3* и *APOLLO* ассоциированы с апомиксисом и дифференциально экспрессируются в семязачатках половых и апомиктических видов растений из рода *Boechera*. Апо-аллели *APOLLO* находятся под положительным отбором, что характерно для паралогов, которые необходимы для выполнения новой функции.
6. Впервые осуществлена полногеномная сборка и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* и природного апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta*. Геномы апомиктических гибридов отличаются высокой степенью гетерозиготности по сравнению с геномами половых видов, благодаря комбинации нескольких геномов, участвовавших в гибридизационных событиях, и часто наличием добавочных хромосом *Het* и *Del*, которые связаны с апомиксисом. Повторы TR147 и TR167, фланкирующие определенные гены, отличаются у апомиктических и половых видов.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты и выводы опираются на экспериментальные и литературные данные. Исследования проводили с включением в работу большого объема экспериментальных данных, а также с анализом большого объема литературных сведений. Все экспериментальные наблюдения выполняли в нескольких проворностях, с использованием положительного и отрицательного контроля, использовали t-статистику, для оценки фенотипа мутантных растений применяли критерий согласия χ^2 , геномные данные были получены с использованием статистики на основе k-mer анализа и других статистических методов анализа, перечисленных в главе Материалы и методы. Корректность проведенных исследований подтверждена публикацией основных результатов диссертации в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах и изданиях.

Личный вклад автора в проведение исследования

Представленная работа, включая ее планирование, получение материала, результатов и написание текста диссертации, является итогом многолетних (1996–2023 гг.) исследований диссертанта. Работа выполнена непосредственно автором, в некоторых случаях работа осуществлялась в рамках совместной деятельности с коллегами. Автор принимал участие во всех этапах работы, ему принадлежит формулировка проблемы, постановка целей и задач, планирование, им получены анализируемые мутантные растения, подготовлен материал для полногеномного секвенирования, произведена обработка результатов и их интерпретация. Автором проанализировано большое количество литературы. Изложенные в диссертации материалы были опубликованы в научных статьях и представлены на тематических конференциях. Все сообщения на научных конференциях и доклады на семинарах по теме настоящей диссертации были осуществлены непосредственно самим автором.

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены на расширенном заседании лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии и лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН, проведенного также в рамках заседаний Русского ботанического общества (РБО) и Всероссийского общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова (ВОГиС), а также на заседании ученого совета ИБГ УФИЦ РАН. Результаты были доложены на отечественных и международных конференциях и совещаниях: 17-м Международном конгрессе по исследованию полового размножения растений (ICSPRR), Польша (Люблин, 2002); Совещанию по эмбриогенезу и регуляции развития растений, Италия (Турин, 2003); Конференции по исследованию гаметофитов растений, Швейцария (Аскона 2003); 18-м Международном конгрессе по исследованию полового размножению растений (ICSPRR), Китай (Пекин, 2004); XII Конференции по эмбриологии растений, Польша (Краков, 2005); Конференции по растениеводству, Великобритания (Кардифф, 2009); Всемирном эпигенетическом конгрессе, Германия (Берлин, 2009); Всемирном конгрессе AgriGenomic, Бельгия, (Брюссель, 2010); Симпозиуме по эпигенетике в Осло, Норвегия (Осло, 2014); Конференции Последние достижения в области развития растений и их реагирования на окружающую среду, Япония (Авадзи, 2016); XXV – XXVII Конференциях по геномам растений и животных (PAG), США, Калифорния (Сан-Диего, 2017 – 2019); 5-м Конгрессе по геномике растений и генетическому редактированию, Нидерланды (Амстердам, 2017); Международной конференции «Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растений», Белоруссия (Минск, 2017); IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (С.-Петербург, 2018); 25-м Международном конгрессе по исследованию полового размножению растений (ICSPRR), Япония (Гифу, 2018); 11-ой Международной конференции «Биоинформатика» регуляции и структуры генома\системной

биологии BGRS\SB-2018 (Новосибирск, 2018); V Международной конференции «Молекулярная филогенетика и биобанкирование биоразнообразия» (MolPhy) в МГУ (Москва, 2018); VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, (Петербург, 2019); 26-м Международном конгрессе по исследованию полового размножения растений (ICSPRR), Чехия (Прага, 2022).

А также в качестве приглашенного докладчика автор докладывал результаты на научных семинарах и школах: семинаре в Королевском датском институте сельскохозяйственных наук DIAS, Дания, май 2003 г.: «Gametophytic and Zygotic Embryo Lethal Mutants in *Arabidopsis*»; институтском семинаре в Институте биологии растений Цюрихского университета, Швейцария, май 2003 г.: «Stranger Than Eden: EXOTIC Mutants in *Arabidopsis*»; семинаре в лаборатории клеточной биологии и биологии развития, Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания, май 2003 г.: «Generation and Analysis of Semi-Sterile Mutants in *Arabidopsis*»; семинаре в Школе биологических и молекулярных наук, Оксфордский университет Брукса, Оксфорд, Великобритания, июнь 2004 г.: «Application of Microscopic Techniques for the Investigations in Plant Development»; семинаре на кафедре зоологии, экологии и растениеводства, Университетский колледж Корка, Корк, Ирландия, октябрь 2004 г.: «Role of The Ubiquitin 26S Proteasome Pathway in Plant Development»; семинаре в институте молекулярной биологии растений CNRS, Страсбург, Франция, декабрь 2004 г.: «The Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic Pathway in Plant Reproduction»; семинаре в институте биотехнологии Швейцарского федерального технологического университета (ETH), Цюрих, Швейцария, январь 2005 г.: «Utilization of the Ubiquitin 26S Proteasome Pathway in Biotechnology»; семинаре в Национальном институте сельскохозяйственной ботаники (NIAB), Кембридж, Великобритания, сентябрь 2006 г.: «The role of the ubiquitin/ proteasome pathway in plant embryogenesis and morphogenesis, under the scope for plant breeding and genetics»; доклад на заседании Русского ботанического общества, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия, октябрь 2006 г.: «Скрининг и молекулярно-генетический анализ гаметофитных и эмбриолетальных мутантов арабидопсиса»; семинаре в

университете Билефельда, Германия, май 2011 г.: «Genetics of Female Gametophytic and Embryo-lethal Mutants of *Arabidopsis thaliana*»; доклад в университете Восточной Англии, Великобритания, июнь 2012 г.: «Identification of mechanisms of cell-cell interaction that contribute to identity maintenance in tissue»; VI Международной школе молодых ученых «Геномика и системная биология», Москва - Звенигород, ноябрь 2014 г.: «Эпигенетика – вторичный код генома, ее роль в фенотипической пластичности»; V Международной школа «Эмбриология, генетика и биотехнология», Санкт-Петербург, октябрь 2016 г.: «Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса»; VII Межд. Школе молодых ученых «Геномика и системная биология», Москва-Звенигород, ноябрь 2016 г.: «Молекулярно-генетические свойства репродукции растений»; Первой международной школе-конференции ВИР по количественной генетике, Санкт-Петербург, июль 2018: «Геномные исследования апомиксиса и его молекулярно-генетическая регуляция»; Центр Менделя CEITEC, университет Масарика, весенние семинары 2019 г., Брно, Чехия, апрель 2019 г.: «Sexual and Apomictic Development: From Biology to Genomics»; семинаре в Юго-восточном университете Nova, Флорида, США, май 2022: «Reference free heterozygous plant genome assembly».

Публикации

По материалам диссертации было опубликовано 30 работ, из них 26 статей в рецензируемых периодических и продолжающихся изданиях, в том числе 23 – в журналах из «Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», включая высокорейтинговые рецензируемые журналы (EMBO J., Cell, Plants, Epigenomes, The Plant Cell, The Plant J., Sex Plant Reproduction, Plant Biotechnology, Taxon и др.), 3 статьи в монографиях и 1 учебное пособие. 23 публикации реферируются системой «Web of Science» и одновременно входят в систему «Scopus».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация выполнена в полном объеме, тема и содержание соответствуют научной специальности (1.5.3 Молекулярная биология), оформление работы соответствует требованиям Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» и Приказа Минобрнауки России от 10 ноября 2017 г. № 1093 «Об утверждении Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук».

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, основной части и заключения. Основная часть включает в себя семь глав с выводами, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 714 наименований. Работа изложена на 441 странице машинописного текста и включает 82 рисунка и 38 таблиц.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в подготовке материала, проведении исследований, биоинформатической обработке результатов, получении данных и их обсуждении коллегам из лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН, коллегам, аспирантам и студентам из Центра геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского СПбГУ, а также зарубежным коллегам, прежде всего, из лаборатории генетики развития растений института биологии растений Цюрихского университета в Швейцарии.

Конкурсная поддержка работы

Результаты диссертации частично получены благодаря финансовой поддержке автора диссертации Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 15-54-45001, 16-54-21014, 20-54-46002).

Глава 1. Половое и бесполое размножение посредством семян

Важнейшая стадия жизненного цикла покрытосеменных (цветковых) растений — это способность к продолжению рода с помощью репродуктивной системы. Половое размножение или амфимиксис (греч. *amphí* — с обеих сторон и *míxis* — смешение) является одним из главных процессов, ведущих к самосохранению видов и возникновению генетического разнообразия в потомстве. Основные атрибуты полового размножения — это мейоз и оплодотворение. При мейозе происходит рекомбинация гомологичных хромосом и кроссинговер, что способствует созданию новых генетических комбинаций на основе наследственного материала родителей, а также имеет место редукция количества хромосом вдвое (Dresselhaus et al., 2016; Брюхин, 2017). В результате оплодотворения происходит слияние гаплоидных гамет, яйцеклетки и спермия, что приводит к возникновению диплоидной зиготы, первой клетки нового организма, которая содержит рекомбинированный генетический материал родителей.

Покрытосеменные растения размножаются преимущественно половым путем. Они производят семена, которые образуются в результате слияния гаплоидных мужских и женских гамет. Мейоз и оплодотворение как основные признаки полового размножения обеспечивают образование генетически изменчивого диплоидного потомства. Устойчивые генетические изменения в популяциях благодаря мейотической рекомбинации и большого количества мутаций выступают источником, влияющим на эволюцию популяции путем ускорения или ограничения скорости адаптации популяции. Еще Дарвин считал, что половое размножение невыгодно с точки зрения затраты энергии, так как особи не могут производить потомство самостоятельно (Darwin, 1862a, 1876). Однако он признал, что перекрестное оплодотворение оказывает непосредственное положительное влияние на потомство, и таким образом оправдывает затраты энергии на половое размножение благодаря полученному преимуществу, уравновешивающему недостаток, связанный с производством самцов (Darwin, 1862b). Под «перекрестным оплодотворением» Дарвин подразумевал скрещивания

между отдельными организмами, так как считал, что эффект самооплодотворения аналогичен эффекту партеногенеза. В те времена Дарвин не знал о существовании гомо- и гетерозиготности. Позднее популяционно-генетическая теория «Фишера-Мюллера» также показала, что половое размножение очень затратное, и признала существование пола в природе парадоксальным. В то же время эта теория акцентирует внимание, в частности, на преимуществах полового размножения за счет действия комбинации полезных мутаций, отсутствующих у бесполок организмов (Muller, 1932; Fisher, 1999). Впоследствии было предложено несколько теорий преимуществ полового размножения перед бесполом. Эти теории можно разделить на два основных типа: «мутационные» теории, считающие, что сексуальность помогает избавиться от вредных мутаций (эффект Хилла-Робертсона) (Hill, Robertson, 1966; Felsenstein, 1976) и «экологические» теории, утверждающие, что сексуальность способствует формированию полезных признаков и изменчивости, тем самым производя материал для отбора и эволюции.

Однако недостатком полового размножения является сегрегация полезных признаков в последующих поколениях, таким образом, что потомство может потерять удачные комбинации родительских генов (Spillane et al., 2004; Брюхин, 2017; Brukhin et al., 2019). Crow и Kimura (1965) показали, что, согласно модели Фишера-Мюллера, половое размножение может быть полезным только при определенных условиях, таких как большие размеры популяции и относительно частое возникновение мутаций. Они продемонстрировали, что в случае ко-адаптированных генных комплексов, секс и рекомбинация могут быть практически невыгодными.

Недавние исследования на популяционно-генетических моделях поставили под сомнение традиционный взгляд на мутации *de novo* как на основной источник адаптивных генетических вариаций, предполагая, что в короткие промежутки времени ранее существовавшие генетические и эпигенетические вариации могут обеспечить лучший субстрат для быстрого фенотипического ответа на требования окружающей среды и давление отбора (Messer et al., 2016). Однако в природе относительно небольшая доля покрытосеменных размножается бесполом

(апомиктическими) семенами, что противоречит эволюционным теориям. Такие растения производят семена после образования нередуцированных гамет, сформировавшихся без мейоза, при помощи механизма, называемого апомейозом, и развития зародыша посредством партеногенеза, независимого от оплодотворения (Хохлов, 1946; 1970; Модилевский, 1948; Петров, 1964; 1976; 1988; Солнцева, 1970; Nogler, 1984; Asker, Jerling, 1992; Grossniklaus, 2001; Bicknell, Koltunow, 2004; Van Dijk; 2009, Kotani et al., 2014; Брюхин, 2017). Эти растения производят клональное потомство, что значительно влияет на существующую структуру популяций, уменьшая поток генов, образуя генетическую однородность и уменьшая изменчивость особей в популяции. Таким образом, апомиктические растения обладают отличными от амфимиктических (размножающихся половым путем) растений репродуктивными и геномными механизмами. Изучение апомиксиса позволяет исследовать такие биологически важные вопросы, как происхождение мейоза, понимание основ апомейоза, образование семян, роль и значение полового размножения в поддержании и распространении генетических изменений, экологической адаптации и создании разнообразия. Например, при ограниченном потоке генов и потере генетической разнородности апомиктические растения традиционно считались обреченными на вымирание (Darlington 1939, Grant 1981). Тем не менее современные исследования опровергли эту точку зрения и указывают на то, что апомиксис связан с увеличением разнообразия (Hojsgaard et al., 2014), предполагая, что он фактически может способствовать появлению новых полиплоидов (Hojsgaard, 2018) и диверсификации покрытосеменных растений.

1.1 Особенности полового размножения растений

Жизненный цикл растений представляет собой чередование диплоидного спорофита (спорообразующего организма) и гаплоидного гаметофита (гаметообразующего организма). Женский гаметофит (= зародышевый мешок) цветковых растений формируется в семязачатке, специализированной структуре внутри завязи, после оплодотворения он дает начало семени. Женский гаметофит

содержит небольшое количество клонально образовавшихся четырех типов клеток, он может служить моделью для изучения многих фундаментальных процессов, которые имеют решающее значение для развития (Brukhin et al., 2005a; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017). Женский гаметофит развивается скоординировано вместе со спорофитными тканями семячатка, обеспечивая идеальную систему для изучения формирования клеточных паттернов, межклеточной коммуникации, и роли происхождения и положения клеток в спецификации и дифференцировке. Несмотря на важную роль, которую играет гаметофит в размножении, в настоящее время не так много лабораторий в мире изучают его развитие, многие молекулярные и генетические аспекты формирования и функционирования женского гаметофита до сих пор остаются невыясненными.

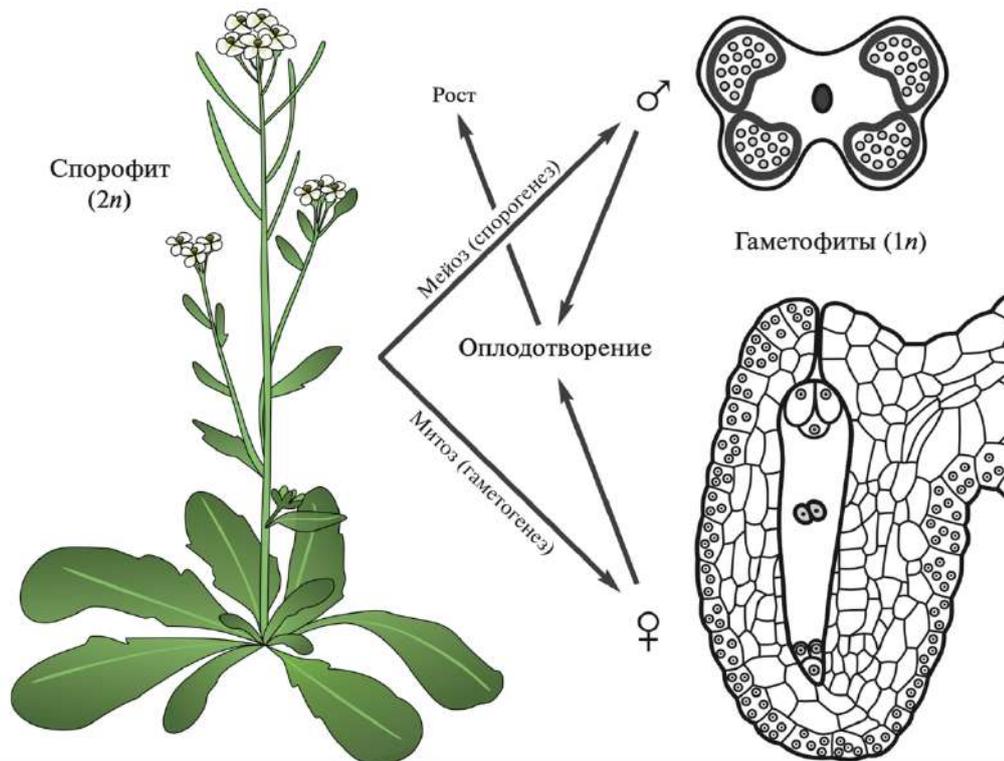


Рисунок 1 - Схема чередования спорообразующего (спорофита) и полового гаметообразующего (гаметофита) поколений при развитии и размножении цветковых растений (Брюхин, 2017). Спорофит обычно является наиболее заметной формой существования цветковых растений, его клетки имеют двойной набор хромосом (2n). В тканях спорофитов, в семячатках и пыльниках,

развиваются мега- и микроспоры соответственно, из которых в результате последующих мейотических и митотических делений формируются гаплоидные поколения, содержащие один набор хромосом ($1n$), женские (зародышевые мешки) и мужские (пыльцевые зерна) гаметофиты. Женские и мужские гаметофиты формируют яйцеклетку (женскую гамету) и спермии (мужские гаметы). После двойного оплодотворения, при котором пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок, один спермий оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку, а другой диплоидную центральную клетку, что дает начало развитию семени. Оплодотворенная яйцеклетка (зигота) с восстановленным набором хромосом ($2n$) дает начало зародышу, новому спорофиту, который формирует новое растение, образующее споры. Справа изображены срез пыльника с пыльцевыми зернами (вверху) и семязачатка с зародышевым мешком (внизу), (Брюхин, 2017).

1.2 Эволюция и развитие женского гаметофита (зародышевого мешка)

Появление чередующихся поколений в жизненном цикле растений возникло на заре эволюции. У многих низших растений доминирующим свободноживущим поколением являются гаметофиты, тогда как у высших растений доминирует поколение спорофитов. Данное различие использовалось и для разделения низших и высших растений. Например, у многих водорослей преобладающей фазой жизненного цикла является гаплоидный гаметофит, а диплоидная спорофитная фаза является лишь переходной (Pickett-Heaps, 1975, Brukhin et al. 2005a).

По мере того, как растения адаптировались к жизни на суше, фаза спорофита стала доминирующей, за исключением мохообразных, у которых преобладающим поколением остается гаметофит и его распространение зависит от влажности местообитания. У низших сосудистых растений таких, как папоротники, явно доминирует спорофит, образующий на листьях спорангии в виде гроздей (сорусов). При созревании эти спорангии распыляют споры, которые при попадании на влажную поверхность прорастают, образуя заросток, или гаметофит. Заросток содержит в своих клетках хлорофилл и произрастет независимо от спорофита. Он

образует антеридии (мужские репродуктивные органы) и/или архегонии (женские репродуктивные органы), которые производят соответственно мужские и женские гаметы. Для движения сперматозоидов и оплодотворения требуется вода.

По мере эволюции формирования семян у наземных растений гаметофитная фаза сократилась еще больше, а сам гаметофит становился все более глубоко внедренным в репродуктивные структуры спорофита, его существование и способность к оплодотворению все больше полагались на спорофит, чем на воду. У высших растений эта редукция завершилась образованием мужского гаметофита, или микрогаметофита (то есть пыльцевого зерна), и женского гаметофита, или мегагаметофита (зародышевого мешка).

Мужской гаметофит (микрогаметофит) цветковых обычно представляет собой 3-клеточную структуру, состоящую из двух спермиев, заключенных в вегетативную клетку (Nawaschin 1898; Coulter, Chamberlain, 1901; Maheshwari, 1950; da Costa-Nunes, Grossniklaus, 2003). Микрогаметофиты происходят из диплоидной материнской клетки микроспор, которая подвергается мейозу с образованием четырех гаплоидных микроспор. Каждая гаплоидная микроспора претерпевает два митотических деления. При первом делении образуется крупная вегетативная клетка (основной функцией которой является доставка спермиев в женский гаметофит) и генеративная клетка меньшего размера (Nawaschin, 1898; Maheshwari, 1950). Позже генеративная клетка претерпевает второе митотическое деление с образованием двух сперматозоидов (спермиев) (Ma, 2005).

Определяющими признаками, по которым покрытосеменные растения отличаются от голосеменных, это морфология и способы оплодотворения женского гаметофита (Baroux et al., 2002). У голосеменных растений женский гаметофит значительно крупнее, чем у покрытосеменных, и состоит из сотен или даже тысяч клеток, он содержит несколько архегониев (Maheshwari, 1950; Brukhin, Vozhkov, 1996; Brukhin et al., 2005a). Большой размер женского гаметофита означает, что голосеменные растения не нуждаются в эндосперме для питания развивающегося зародыша. Так называемый «эндосперм» голосеменных представляет собой гаплоидный гаметофит, хотя обычно образуются два спермия,

только один из них участвует в оплодотворении яйцеклетки, тогда как другой дегенерирует.

У покрытосеменных растений женский гаметофит, или мегагаметофит, развивается внутри семязачатка, защищенного нуцеллусом и покровами семязачатка (интегументами). Структура и организация женского гаметофита различаются у покрытосеменных, наиболее распространенной формой является тип *Polygonum*, который присутствует у 70% всех покрытосеменных растений (Maheshwari, 1950; Brukhin et al. 2005a).

Женский гаметофит *Polygonum*- типа является результатом точно скоординированного мегаспорогенеза и мегагаметогенеза. Во время мегаспорогенеза диплоидная материнская клетка мегаспор (ММС) подвергается мейозу с образованием четырех гаплоидных мегаспор, одна из которых выживает, а три других дегенерируют (рис. 2). Затем, во время мегагаметогенеза, выжившая функциональная мегаспора претерпевает три раунда митоза, образуя 8-ядерный синцитий (рис. 2). В результате целлюляризации образуются семь клеток, принадлежащих к четырем разным типам: яйцеклетка и две синергиды (так называемый яйцевой аппарат, расположенный на микропилярном полюсе зародышевого мешка), двуядерная центральная клетка и три антиподальные клетки, расположенные на халазальном полюсе зародышевого мешка. Несмотря на небольшое количество клеток и незначительный размер, женский гаметофит является центральной структурой в репродукции покрытосеменных растений. Он участвует в проведении и приеме пыльцевой трубки, оплодотворении, активации яйцеклетки и материнском контроле развития семян (Grossniklaus, Schneitz, 1998; Yadegari, Drews, 2004; Brukhin et al., 2011; Brukhin, Morozova, 2011). Когда пыльцевая трубка достигает зародышевого мешка, два спермия выходят из нее и проникают в одну из синергид, которая после этого дегенерирует. Затем один спермий мигрирует к центральной клетке, и в результате плазмогамии диплоидного

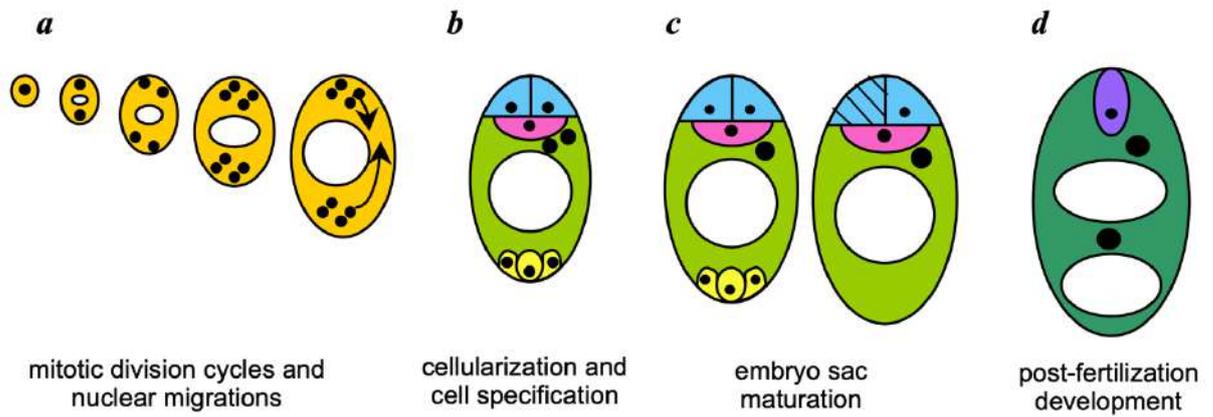


Рисунок 2 - a–d, Схематическое изображение развития женского гаметофита *Polygonum*-типа (Brukhin et al. 2005a). а) В синцитии происходят три свободных деления ядра функциональной мегаспоры с образованием 8-ядерного женского гаметофита. По одному ядру от каждого полюса (полярные ядра) мигрируют и, в конечном итоге, они становятся ядрами центральной клетки. d) Благодаря целлюляризации (клеткообразованию) формируется типичный 7-клеточный 8-ядерный женский гаметофит с двумя клетками синергид (голубые), одной яйцеклеткой (сиреневая), двуядерной центральной клеткой (зеленая) и тремя антиподальными клетками (желтые). с) Перед оплодотворением женские гаметофиты полностью сформированы: два полярных ядра сливаются, образуя гомодиплоидное ядро центральной клетки, антиподы подвергаются программированной клеточной гибели, а одна из синергид дегенерирует по мере вхождения в нее пыльцевой трубки. d) Во время двойного оплодотворения один сперматозоид сливается с яйцеклеткой, образуя диплоидную зиготу (фиолетовая), а второй сперматозоид оплодотворяет центральную клетку, образуя триплоидный эндосперм (темно-зеленый). Первичное ядро эндосперма делится раньше зиготы, образуя синцитий. (Brukhin et al., 2005a).

ядра центральной клетки с ядром спермия, образуется триплоидное ядро эндосперма. Другой спермий проникает в яйцеклетку, образуя диплоидную зиготу. Из оплодотворенной триплоидной центральной клетки формируется эндосперм, а диплоидная яйцеклетка дает начало зародышу. Формирование жизнеспособных

семян зависит от успешного двойного оплодотворения и скоординированного развития зародыша, эндосперма и материнской семенной оболочки спорофитного происхождения. Образовавшееся зрелое семя заключают в себе зародыш, который является следующим поколением спорофита (Brukhin et al. 2005a).

1.3 Структурное разнообразие женских гаметофитов покрытосеменных

Основные черты отличия покрытосеменных и голосеменных, упомянутые выше, не позволяют, точно определить эволюционные различия внутри самих этих таксономических групп. Трудности возникают в связи с эволюцией разных типов женских гаметофитов внутри покрытосеменных растений. Эти различия могут быть результатом количества функциональных ядер мегаспор, которые принимают участие в формировании зародышевого мешка (т. е. моноспорические, биспорические или тетраспорические). Существует два типа моноспорических женских гаметофитов: тип *Polygonum*, образующий 8-ядерный зародышевый мешок (Hofmeister, 1847; Strassburger, 1879; Palm, 1915; Maheshwari, 1948) (рис. 2 и 3а), и тип *Oenothera*, образующий 4-ядерный зародышевый мешок, свойственный только представителям семейства Onagraceae (Maheshwari, 1948; Hofmeister, 1847; Geerts, 1908; Modilewski, 1909). В отличие от *Polygonum*-типа, в зародышевом мешке *Oenothera*-типа происходит всего два митотических деления ядра. При развитии зародышевого мешка *Polygonum*-типа функциональное ядро мегаспоры совершает первичное митотическое деление. Затем два дочерних ядра мигрируют к противоположным полюсам синцития, тем самым устанавливая проксимально-дистальную ось и полярность зародышевого мешка (Рис. 3а). Между двумя ядрами образуется крупная вакуоль, которая увеличивается в размерах по мере развития зародышевого мешка. Каждое из ядер претерпевает еще два митотических деления до начала целлюляризации (формирования клеточных стенок между ядрами). Во время целлюляризации три ядра на микропилярном полюсе дают начало двум синергидам и яйцеклетке, а три ядра на халазальном полюсе образуют три антиподальные клетки. Остальные ядра – по одному на каждом полюсе (полярные

ядра) – мигрируют к центру и обычно сливаются (кариогамия), образуя гомодиплоидное ядро центральной клетки (рис. 2 и 3 а). В области, где встречаются синергиды, яйцеклетка и центральная клетка, формируется прерывистая клеточная стенка (Mansfield, 1991). Это, вероятно, необходимо для возможности плазмогамии при проникновении спермиев во время оплодотворения. На последних стадиях развития зародышевого мешка три антиподальные клетки обычно дегенерируют (рис. 2с), но у некоторых видов, например у *Zea mays*, они продолжают деление (Kiesselbach, 1949). У *Oenothera* зародышевый мешок развивается из микропилярной мегаспоры. После двух митотических делений одно из ядер целлюляризуется, образуя яйцеклетку, два ядра формируют синергиды, а одно оставшееся становится единственным полярным ядром. Зародышевый мешок *Oenothera*-типа монополярен, так как все ядра расположены на микропилярном полюсе развивающегося зародышевого мешка (Maheshwari, 1950). Интересно отметить, что в некоторых агамных комплексах одновременно могут сосуществовать два типа зародышевого: например, половые формы *Panicum maximum* образуют биполярный 8-ядерный женский гаметофит, тогда как апомиктические формы имеют монополярный 4-ядерный зародышевый мешок (Savidan, 1980; Grossniklaus, 2001; Brukhin et al. 2005a).

Биспорические зародышевые мешки образуются из ядер двух мегаспор, которые не разделены клеточной перегородкой, каждое из этих ядер претерпевает два митотических деления образуя два 8-ядерных, 7-клеточных биполярных зародышевых мешка. Наиболее распространенным типом развития биспорического зародышевого мешка является *Allium*-тип. Еще одна разновидность формирования женского гаметофита наблюдается при участии всех четырех мегаспор в образовании зародышевого мешка. Например, зародышевые мешки *Peperomia*-типа, которые содержат 16 ядер и состоят из яйцеклетки и синергиды на микропилярном полюсе, и большого вторичного ядра эндосперма, образованного слиянием оставшихся 8 ядер, в то время как остальные 6 ядер формируют антиподы (Johnson, 1900). В зародышевых мешках *Penaea*-типа 16 ядер образуют четыре отдельные группы на каждом полюсе и с каждой стороны

зародышевого мешка. Одно ядро из каждого квартета остается свободным (т. е. 4 полярных ядра) и движется к центру зародышевого мешка, а остальные три целлюляризируются. Как правило, одна клетка в группе из трех клеток на микропилярном конце является функциональной яйцеклеткой. Зародышевые мешки *Acalypha indica*, хотя и похожи на зародышевые мешки типа *Pentaea*, имеют отличное расположение ядер и клеток (3b). У *Acalypha indica* 16 ядер объединены в четыре отдельные группы на четырех полюсах. Позже 2 ядра из каждого квартета остаются свободными и мигрируют к центру зародышевого мешка, а остальные

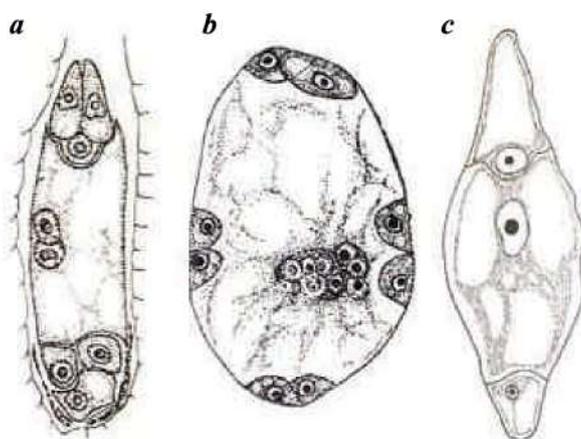


Рисунок 3 - А-С. Некоторые примеры, иллюстрирующие структурное разнообразие женских гаметофитов покрытосеменных растений (Brukhin et al. 2005a). А) наиболее распространенный 7-клеточный 8-ядерный зародышевый мешок *Polygonum*-типа с яйцевым аппаратом, состоящим из яйцеклетки и двух синергид на микропилярном полюсе (вверху), двух полярных ядер в центре и трех клеток-антипод на халазальном полюсе (Герасимова-Навашина, 1957). В) зародышевый мешок *Pentaea*-типа у *Acalypha indica*: 16-ядерный зародышевый мешок с 8 свободными ядрами в центре и четырьмя группами по две клетки по периферии (Maheshwari, Johri, 1941). С) зародышевые мешки *Plumbagella*-типа, яйцеклетка, синергиды отсутствуют (вверху), антиподальная клетка триплоидна, а ядро центральной клетки тетраплоидное (Fagerlind, 1938), (Brukhin et al., 2005a).

становятся ядрами клеток. Таким образом, формируются четыре отдельные группы по две клетки на периферии и восемь свободных ядер в центре (Maheshwari and Johri, 1941) (рис. 3b). Некоторые тетраспорические зародышевые мешки не образуют 16 ядер. Например, у *Plumbagella* (Maheshwari, 1950) ядра мегаспор мигрируют, одно к микропилярному концу, остальные три к халазальному полюсу, где они сливаются, образуя триплоидное ядро. Затем производные этих ядер делятся, образуя два гаплоидных микропилярных ядра и два триплоидных халазальных ядра. Гаплоидное ядро, ближайшее к микропилярному концу, преобразуется в яйцеклетку, а триплоидное ядро, ближайшее к халазальному концу, образует единую антиподальную клетку. Оставшиеся два ядра сливаются с образованием тетраплоидного вторичного ядра эндосперма, при этом клетки синергиды не образуются (Fagerlind, 1938) (рис. 3c).

Огромное разнообразие путей развития зародышевых мешков обеспечивает основу для изучения эволюции программ их развития. Характеристика генов, играющих ключевую роль в развитии и функционировании зародышевого мешка, совместно с цитологическими данными может дать представление об эволюции путей развития женского гаметофита.

Зародышевый мешок *Polygonum*-типа является наиболее распространенным и наиболее изученным типом зародышевого мешка. Тем не менее, несмотря на глубокие знания исследователей о его морфологии, мало известно о молекулярно-генетических механизмах, контролирующих его развитие. В прошлом прогрессу и энтузиазму в идентификации молекулярных механизмов регуляции развития, возможно, препятствовали труднодоступность и небольшой размер женского гаметофита. Хотя женский гаметофит *Polygonum*-типа состоит всего из семи клеток, эти клетки в состоянии выполнять определенные функции, необходимые для размножения. Мутационный анализ позволяет выявить эти функции, а также лежащие в их основе пути развития. Получение новых гаметофитных мутантов в результате крупномасштабных проектов по инсерционному мутагенезу (Page and Grossniklaus, 2002; Brukhin et al., 2011; Брюхин, 2017), а также появление новых инструментов для анализа отдельных клеток на молекулярном уровне (Day et al.,

2005; Schmidt et al., 2012; 2014; Underwood et al., 2022) открывают уникальные возможности для выявления молекулярно-генетических механизмов, участвующих в развитии и функционировании гаметофита. Получение гаметофитных мутантов и выявление генетических и молекулярных механизмов развития гаметофита будут рассмотрены во 2-й главе.

1.4 Гаметофитный апомиксис и его значение для сельского хозяйства

Термин “апомиксис” был введен немецким ученым Гансом Винклером в 1908 году для обозначения бесполого размножения растений (Winkler, 1908), хотя деталей этого процесса, как и четкого определения, в силу понятных причин, являющихся следствием уровня развития биологии того времени, дано не было. В настоящее время под апомиксисом подразумевают семенное размножение без оплодотворения яйцеклетки, которое приводит к образованию генетически однородного потомства (Хохлов, 1946; 1970; Петров, 1964; 1976; 1988; Солнцева, 1970; Nogler, 1984; Asker, Jerling, 1992; Naumova et al., 2001; Grossniklaus, 2001; Bicknell, Koltunow, 2004; Van Dijk, 2009; Kotani et al., 2014; Брюхин, 2017). При половом размножении яйцеклетка и центральная клетка — гаметы редуцированного женского гаметофита (зародышевого мешка), каждая оплодотворяется одним спермием с образованием зародыша и эндосперма (Герасимова-Навашина, 1957; 1971; Поддубная-Арнольди, 1976; Dresselhaus et al., 2016). Напротив, апомиктические эмбрионы не являются результатом слияния мужских и женских гамет, а развиваются клонально из нередуцированных гамет в семязачатке (матроклинное наследование). В настоящее время сообщается, что апомиксис был обнаружен у растений из 148 родов, принадлежащих к более чем 40 семействам покрытосеменных (Nogler, 1984a; Carman, 1997; 2007; Hojsgaard et al., 2014). Способы протекания апомиксиса разнообразны, также существуют и различные классификации апомиксиса (Fagerlind, 1940; Stebbins, 1941; Gustafsson, 1946, 1947; Модилевский, 1948; Maheshwari, 1950; Battaglia, 1963; Хохлов, 1967; 1970; Rutishauser, 1969; Солнцева, 1970; 1988; Поддубная–Арнольди, 1976; Петров,

1988; Батыгина, 1999; Crane, 2001; Наумова, 2008; Брюхин, 2017), но с точки зрения развития все они могут рассматриваться как нарушение регуляции ключевых этапов программы полового развития (Koltunow, 1993; Grossniklaus et al., 2002; Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019; Schmidt, 2020). Большинство апомиктических видов или отдельных растений часто имеют гибридное происхождение и обычно являются полиплоидными. Таким образом, апомиксис помогает им избавиться от триплоидного блока, возникающего у полиплоидов при мейозе, и осуществлять семенную репродукцию (Burgess et al., 2014). Существует несколько типов апомиксиса, которые наблюдались в природе у разных видов растений. Однако наиболее распространенными являются три типа: диплоспория, апоспория и адвентивная эмбриония (Naumova, 1993; Наумова, 2008; Koltunow, 1993; Brukhin, Morozova, 2011; Брюхин, 2017) (рис. 4). Различные типы апомиксиса отличаются по времени или типу клеток, в которых происходит нарушение регуляции. Довольно распространенной в природе является адвентивная (нуцеллярная и интегументальная) эмбриония, которая связана со спецификой нуцеллусов и интегументов покрытосеменных сохранять тотипотентные клетки и возможностью формировать соматические зародыши из этих клеток (Naumova, 1993; Наумова, 2008; Брюхин, 2017). На ранних этапах развития многие клетки нуцеллуса способны к переключению с митоза на мейотические программы деления, благодаря этому, у ряда покрытосеменных образуется не одна археспориальная клетка, а множественный археспорий. Если же активация клеток нуцеллуса происходит на более поздних стадиях, когда в семени уже идет формирование зародыша, то клетки нуцеллуса, а иногда и интегумента, способны к инициации нуцеллярных либо интегументальных зародышей (Naumova, 1993; Наумова, 2008; Брюхин, 2017). В отличие от адвентивной эмбрионии, при гаметофитном апомиксисе, в нуцеллусе формируется зародышевый мешок (рис. 4). Характерными отличиями гаметофитного апомиксиса от полового размножения являются (1) отсутствие или нарушение мейоза (апомейоз), (2) развитие зародыша из нередуцированной

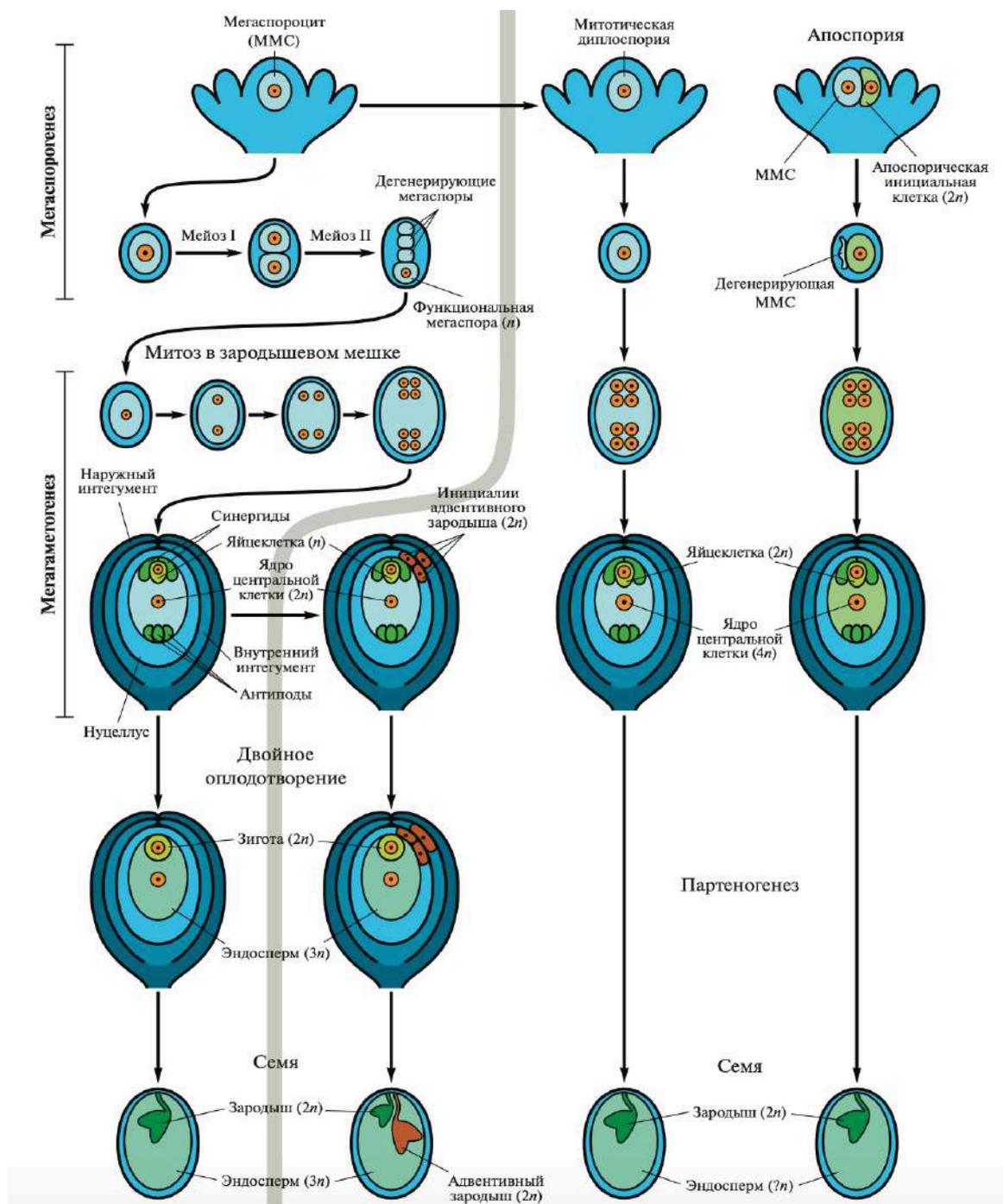


Рисунок 4 - Схема полового (слева) и апомиктического (справа) путей развития (Брюхин, 2017).

При половом пути материнская клетка мегаспор (ММС) совершает два деления мейоза, образуя тетраду гаплоидных мегаспор, три из которых дегенерируют, а одна (функциональная мегаспора) проходит через три митотических деления, формируя зародышевый мешок, или женский гаметофит. Последний состоит из

восьми ядер, образующих семь клеток, при этом яйцеклетка и две синергиды (яйцевой аппарат) находятся у микропиллярного полюса зародышевого мешка, а три антиподы у халазального полюса. Два полярных ядра расположенных в центре зародышевого мешка, позже сливаются и образуют диплоидное ядро центральной клетки. В процессе двойного оплодотворения один спермий оплодотворяет яйцеклетку, образуя зиготу, а второй сливается с ядром центральной клетки, в результате чего возникает первое ядро эндосперма. Синергиды участвуют в привлечении пыльцевой трубки и проведении спермиев к яйцеклетке и центральной клетке. Из оплодотворенной зиготы развивается зародыш, а из центральной клетки питающая зародыш ткань эндосперм. Сформированное зрелое семя состоит из диплоидного зародыша, триплоидного эндосперма и семенной кожуры, образованной из материнских спорофитных клеток интегументов и, в некоторых случаях, нуцеллуса. Справа изображены три типа гаметофитного апомиксиса: спорофитный апомиксис (адвентивная эмбриония) - образование соматических зародышей из спорофитных тканей внутреннего интегумента и нуцеллуса. При этом адвентивный зародыш может развиваться в одном семени вместе с половым зародышем (Naumova, 1993). При апоспории и диплоспории мейоз в материнской клетке мегаспор отсутствует и зародыш развивается партеногенетически из нередуцированной диплоидной яйцеклетки (все ядра зародышевого мешка диплоидны ($2n$)), тогда как эндосперм может быть тетраплоидным ($4n$), в случае его автономного развития, либо более высокой ploидности, в случае псевдогамии, то есть оплодотворения центральной клетки гаплоидным ($1n$) или полиплоидным спермием. При апоспории диплоидный зародышевый мешок развивается из нередуцированной апоспорической инициали, тогда как при диплоспории в первом делении мейоза биваленты не расходятся и второе мейотическое деление не наступает, таким образом вместо тетрады гаплоидных мегаспор формируется диплоспора, состоящая из двух диплоидных клеток, из которой и образуется зародышевый мешок. (Брюхин 2017).

яйцеклетки без оплодотворения (партеногенез) и (3) образование функционального эндосперма путем оплодотворения центральной клетки (псевдогамия) либо без оплодотворения (автономно) (Koltunow, 1993; Koltunow, Grossniklaus, 2003; Hand, Koltunow, 2014; Брюхин, 2017). Развитие функционального эндосперма у апомиктов зависит от изменений в развитии зародышевого мешка или от оплодотворения, а также от способности избегать абортивность семени, вызванную родительским эффектом (импринтинговые барьеры).

Недостатком полового размножения является расщепление полезных признаков в последующих поколениях, таким образом, что потомство может потерять удачные комбинации генов, приобретенные их родителями (Spillane et al., 2004; Брюхин, 2017). Поэтому в последние десятилетия изучение апомиксиса привлекает повышенный интерес ученых благодаря его способности закреплять ценные для сельского хозяйства характеристики во многих поколениях растений. Внедрение апомиксиса в культурные растения позволило бы на длительный срок закрепить сложные генотипы, в том числе и часто используемые в сельском хозяйстве гибриды поколения F1. Это облегчит селекцию сельскохозяйственных культур и производство гибридных семян, что может принести большую пользу фермерам, поскольку предоставит им доступ к высокоурожайным гибридным культурам (Grossniklaus et al., 1998; Grossniklaus et al., 2002; Spillane et al., 2004; Conner and Ozias-Akins, 2017; Брюхин 2017; Brukhin et al., 2019). Еще Н.С. Навашин, Н.И. Вавилов и Г.Д. Карпеченко признавали важность апомиксиса для устойчивого сельского хозяйства и продовольственной стабильности и осознали его колоссальный потенциал, позже было предложено множество возможных вариантов его использования в агрокультурах (Навашин 1933; Карпеченко, 1935; Jefferson, Bicknell, 1996; Vielle-Calzada et al., 1996; Toennissen, 2001; Grossniklaus et al., 2003; Spillane et al., 2004; Conner and Ozias-Akins, 2017 и др.). Более полное понимание молекулярных основ апомиксиса имеет решающее значение для повышения урожайности, что необходимо для обеспечения устойчивого производства продуктов питания, кормов, биоматериалов, волокон и биотоплива.

К сожалению, среди основных сортов сельскохозяйственных культур почти не обнаружено естественных гаметофитных апомиктов, а интрогрессия апомиксиса от диких апомиктических родственников до сих пор не увенчалась успехом (Savidan, 2000; Brukhin et al. 2019).

В то время как у некоторых видов апомиксис может контролироваться одним основным регуляторным локусом (Svidan 2001; Schallau et al., 2010; Conner et al., 2013; Kotani et al., 2014; Galla et al. 2019; Van Dijk et al., 2020; Underwood, 2022), у других он зависит от нескольких локусов. Поэтому генетические основы апомиксиса могут быть довольно разнообразными, включая различные гены или даже сочетание целых дивергентных геномов в гибридах (Brukhin et al., 2019; Brukhin, Baskar, 2019). Эпигенетический контроль экспрессии генов также может оказывать влияние на возникновение и эволюцию апомиксиса (Brukhin, Albertini, 2021). Поэтому представляется перспективной генная инженерия апомиксиса путем комбинации его элементов, генетический контроль каждого из которых может быть решен отдельно.

Регуляция и дерегуляция мейоза и некоторых процессов развития зародышевого мешка является функцией спорофита, например, детерминация клетки нуцеллуса, инициирующей развитие зародышевого мешка (функциональная мегаспора у полового и апоспорическая инициальная клетка у апомиктического семязачатка). Однако основная часть процессов развития является функциями женского гаметофита: инициация зародышевого мешка, контроль циклов деления ядер, процесс двойного оплодотворения, инициация эндосперма и зародыша, а также эпигенетические различия материнского и отцовского геномов. Эти процессы плохо изучены на генетическом и молекулярном уровне. Лучшее понимание молекулярных событий, лежащих в основе перечисленных аспектов полового размножения, способствует созданию инструментов генной инженерии для разработки технологии апомиксиса в сельскохозяйственных культурах.

В качестве альтернативы интрогрессии генов, гены имеющие отношение к апомиксису, могут быть идентифицированы либо путем получения

соответствующих мутантов половых модельных растений, демонстрирующих компоненты апомиксиса, либо путем изоляции соответствующих генов из апомиктических видов (Grossniklaus, 2001; Brukhin et al., 2011; 2019; Брюхин, 2017; Pupilli, Barcaccia, 2012; Rodriguez-Leal, Vielle-Calzada, 2012; Barcaccia, Albertini, 2013; Conner, Ozias-Akins, 2017). Для последнего подхода важным вопросом является выбор удобного модельного апомиктического растения, которое позволит расшифровать молекулярные механизмы, лежащие в основе компонентов апомиксиса. В наших исследованиях мы использовали произведенные нами мутанты модельного растения *Arabidopsis thaliana*, которые будут рассмотрены в главе 2 и природных апомиктов из рода *Boechea*, имеющие относительно небольшой геном и являющиеся близкими родственниками модельного растения арабидопсиса, которые будут рассмотрены в главе 6 (Böcher, 1951; Dobeš et al., 2004a,b; Sharbel et al., 2005; 2010; Voigt-Zielinski et al., 2012; Brukhin et al. 2019; Mandáková et al., 2015; Kliver et al., 2018).

Несмотря на то, что апомиксис рассматривается как один из ключевых феноменов для создания технологий улучшения сельского хозяйства, пока в точности неизвестно, какие гены контролируют этот важный признак, также до сих пор не был секвенирован и собран геном ни одного апомиктического вида растений (Bicknell & Koltunow, 2004; Koltunow и Grossniklaus, 2003; Rodriguez-Leal and Vielle-Calzada, 2012; Брюхин, 2017). Исследователям крайне необходима расшифровка, сборка и аннотация апомиктического генома, что ускорит дальнейшие исследования по молекулярной генетике размножения растений, а также будет способствовать приближению «зеленой революции» в сельском хозяйстве.

Молекулярно-генетическая регуляция и исследование особенностей апомиксиса на полногеномном уровне будут рассмотрены в главе 6.

Глава 2. Молекулярно-генетическая регуляция развития женского гаметофита

2.1 Развитие женского гаметофита покрытосемянных

Как было сказано выше, жизненный цикл цветковых растений представляет собой чередование полового и бесполого поколений, образующего споры диплоидного спорофита, и гаплоидного гаметофита, производящего гаметы, соответственно. Генеративная фаза наступает при формировании цветочной меристемы, которая дает начало пыльнику и завязи, содержащей один или несколько семязачатков. В пыльниках образуются диплоидные материнские клетки пыльцы, которые после двух мейотических делений формируют четыре гаплоидных микроспоры. Микроспора претерпевает два митотических деления, после первого деления образуется генеративное и вегетативное ядро, во втором делении генеративное ядро делится еще раз, образуя два ядра спермиев, каждое из которых после цитокинеза формирует по спермию, принимающих участие в двойном оплодотворении при попадании пыльцы на рыльце пестика. Пыльцевое зерно представляет собой мужской гаметофит. Вегетативное ядро дает начало вегетативной клетке, которая обеспечивает рост пыльцевой трубки и продвижение по ней спермиев во время прорастания пыльцы на рыльце и столбике пестика.

Женские половые клетки (гаметы) формируются в женских гаметофитах, или зародышевых мешках. Рассмотрим развитие наиболее распространенного у покрытосемянных и наиболее изученного зародышевого мешка *Polygonum*-типа на примере *Boechera falcata* (сем. Brassicacea) (рис. 5).



Рисунок 5 - Цветущее растение *Boechea falcata* (сем. Brassicacea).

2.1.1 Мегаспорогенез

Мегаспорогенез – это процесс формирования гаплоидных спор из мегаспороцитов, иначе называемыми материнскими клетками мегаспор (ММС – англ. megaspore mother cell). Мегаспороцит дифференцируется в субэпидермальном слое нуцеллуса из густоплазменной археспориальной клетки, выделяющейся по размеру среди остальных клеток нуцеллуса (Шамров, 2008). Одновременно начинается инициация интегументов (наружных покровов семязачатка) (рис. 6.1). ММС изолируется от клеток нуцеллуса за счет отложения в клеточной стенке каллозы (Rodkiewicz, 1970). При достижении интегументами половины длины нуцеллуса мегаспороцит вступает в мейоз; после первого мейотического деления образуется диада клеток (рис. 6.2), после второго деления (рис. 6.3) – тетрада гаплоидных мегаспор (рис. 6.4), три из которых позже дегенерируют, а функциональная мегаспора, обычно располагается ближе к халазальному полюсу, в дальнейшем она формирует зародышевый мешок (женский гаметофит). По сути, функциональная мегаспора является первой

клеткой зародышевого мешка. В случае формирования множественного археспория, который состоит из нескольких клеток, впоследствии может сформироваться несколько зародышевых мешков, также это может способствовать развитию нуцеллярной адвентивной эмбрионии (Johri, 1992; 2012).

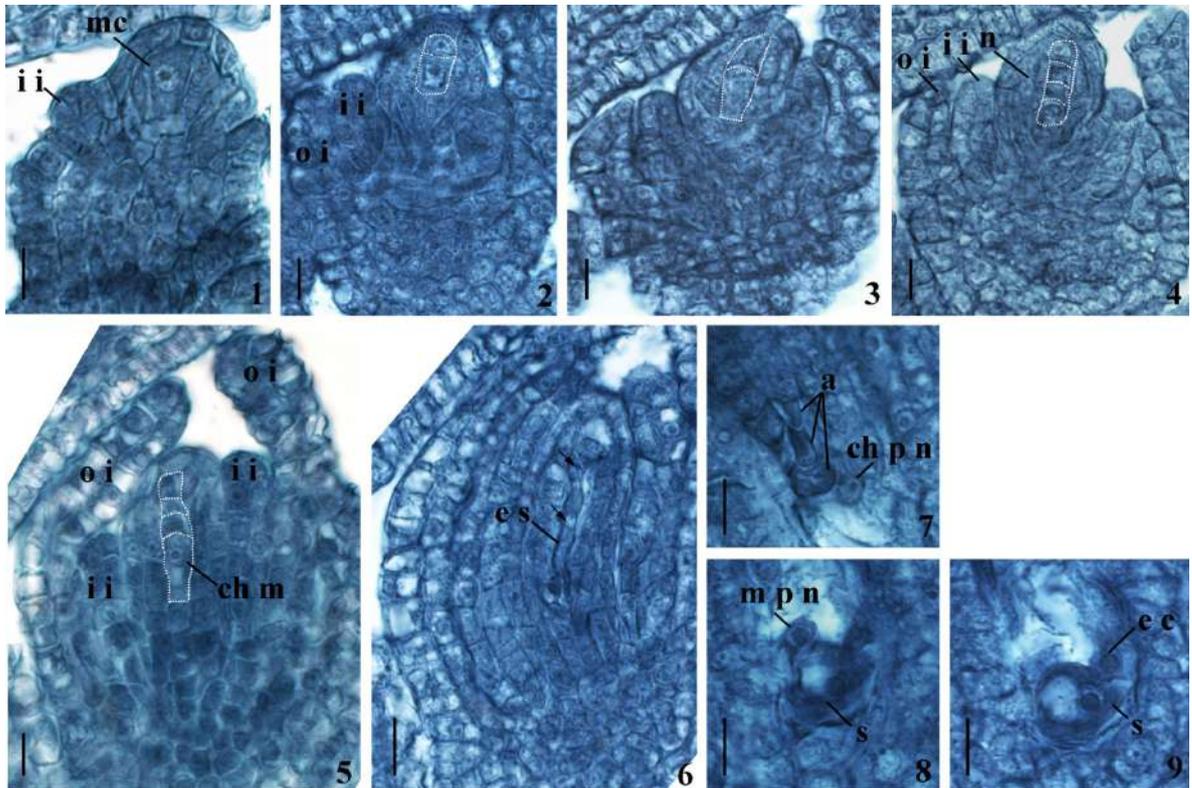


Рисунок 6 - Развитие женского гаметофита у *Boechea falcata*. 1-6 – строение семязачатка на стадиях: мегаспороцита (1), диады (2), второго деления мейоза (3), тетрады мегаспор (4), тетрады мегаспор с дифференциацией халазальной мегаспоры и дегенерацией трех микропиллярных мегаспор (5), 2-ядерного зародышевого мешка (ядра указаны стрелками); 7-9 – строение сформированного зародышевого мешка: антиподы и халазальное полярное ядро на халазальном полюсе (7), яйцевой аппарат состоящий из яйцеклетки и двух синергид (на соседних срезах 8 и 9) и микропиллярное полярное ядро на микропиллярном полюсе (8, 9). а - антиподы, chm – халазальная мегаспора, chpn – халазальное полярное ядро, es - яйцеклетка, es – зародышевый мешок, ii – внутренний интегумент,

mc - мегаспороцит, mpr – микропиллярное полярное ядро, n - нуцеллус, oi – наружный интегумент. Шкала: 10 мкм (1-9).

2.1.2 Мегегаметогенез

Мегегаметогенезом называется развитие женских половых клеток, которые расположены в зародышевом мешке. Процесс начинается с трех последовательных митотических делений функциональной мегаспоры (рис. 2). В итоге формируется 8-ядерный ценоцитный женский гаметофит. После первого деления мегаспоры между двумя ядрами образуется вакуоль (рис. 2 b, c; рис. 6.5). После второго митотического деления на полюсах зародышевого мешка расположены по четыре гаплоидных ядра, процесс, называемый поляризацией зародышевого мешка, при этом вакуоль постепенно увеличивается. По одному ядру с каждого полюса мигрируют в центр зародышевого мешка, они становятся ядрами центральной клетки. Затем следует цитокенез, стадия клеткообразования в зародышевом мешке, в результате чего формируются яйцеклетка и две синергиды на микропиллярном полюсе и три клетки антипод на халазальном полюсе. Полярные ядра остаются ядрами центральной клетки, граница которой совпадает с границами зародышевого мешка, по сути, остальные 6 клеток располагаются внутри центральной клетки (рис. 2c; 6.7–6.9). Перед оплодотворением, в зрелом зародышевом мешке, полярные ядра обычно сливаются, процесс, называемый кариогамией (Brukhin et al., 2005a; Брюхин, 2017).

2.1.3 Двойное оплодотворение

С двойного оплодотворения начинается формирование семени. Процесс называется двойным, поскольку один спермий, из проникшей в зародышевый мешок пыльцевой трубки, оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку, тогда как второй спермий сливается с диплоидным ядром центральной клетки. В результате двойного оплодотворения возникает диплоидная зигота, из которой формируется

зародыш (новый спорофит) и первая клетка триплоидного эндосперма, формирующая питательную ткань для зародыша (Брюхин, 2017).

2.1.4 Начало эндоспермогенеза и эмбриогенеза

Первичное ядро эндосперма, появившееся в результате слияние ядер диплоидной центральной клетки зародышевого мешка и спермия, как правило, делится раньше ядра зиготы, причем кариокинез (деление ядер) не сопровождается цитокинезом (образование клеточных стенок между ними) (рис. 2d). Зигота после оплодотворения остается некоторое время в состоянии покоя, после чего она удлиняется, при этом ее ядро мигрирует из центральной в халазальную часть клетки (Naumova, 1993; 2008). К началу первого деления зиготы, которое происходит ассиметрично, поскольку апикальная клетка А большего размера, чем базальная клетка В (рис. 18), начинается деление ядер эндосперма по периферии образующегося семени. Эндосперм является незаменимой для развития и сохранения зародыша в формирующемся семени питательной тканью, кроме того, он играет важную физиологическую роль в качестве источника фитогормонов и регуляторных молекул, что необходимо для нормального развития зародыша (Brukhin, Morozova, 2011). Согласованное развитие зародыша и эндосперма является важной составной частью развития семени. Для полноценного развития эндосперма большое значение имеет соотношение материнского и отцовского геномов $2m : 1p$. Как известно, после двойного оплодотворения диплоидная зигота содержит один гаплоидный материнский геном (гаплом) и один отцовский гаплом. Тогда как триплоидный эндосперм содержит два материнских гаплома $2m$ (за счет двух гаплов полярных ядер) и одного отцовского гаплома $1p$. Нарушение соотношения женских и мужских геномов в клетках эндосперма приводит, как правило, к остановке развития и абортированию семени (Grossniklaus et al., 1998; Baroux et al., 2017; Брюхин, 2017).

2.2 Развитие пыльника и мужского гаметофита

Стадии развития зародышевых мешков коррелируют с формированием пыльников и пыльцы, поэтому мы также исследовали развитие пыльника у *Boecheira falcata* на цитологическом уровне (рис. 7). Для цветков *B. falcata*

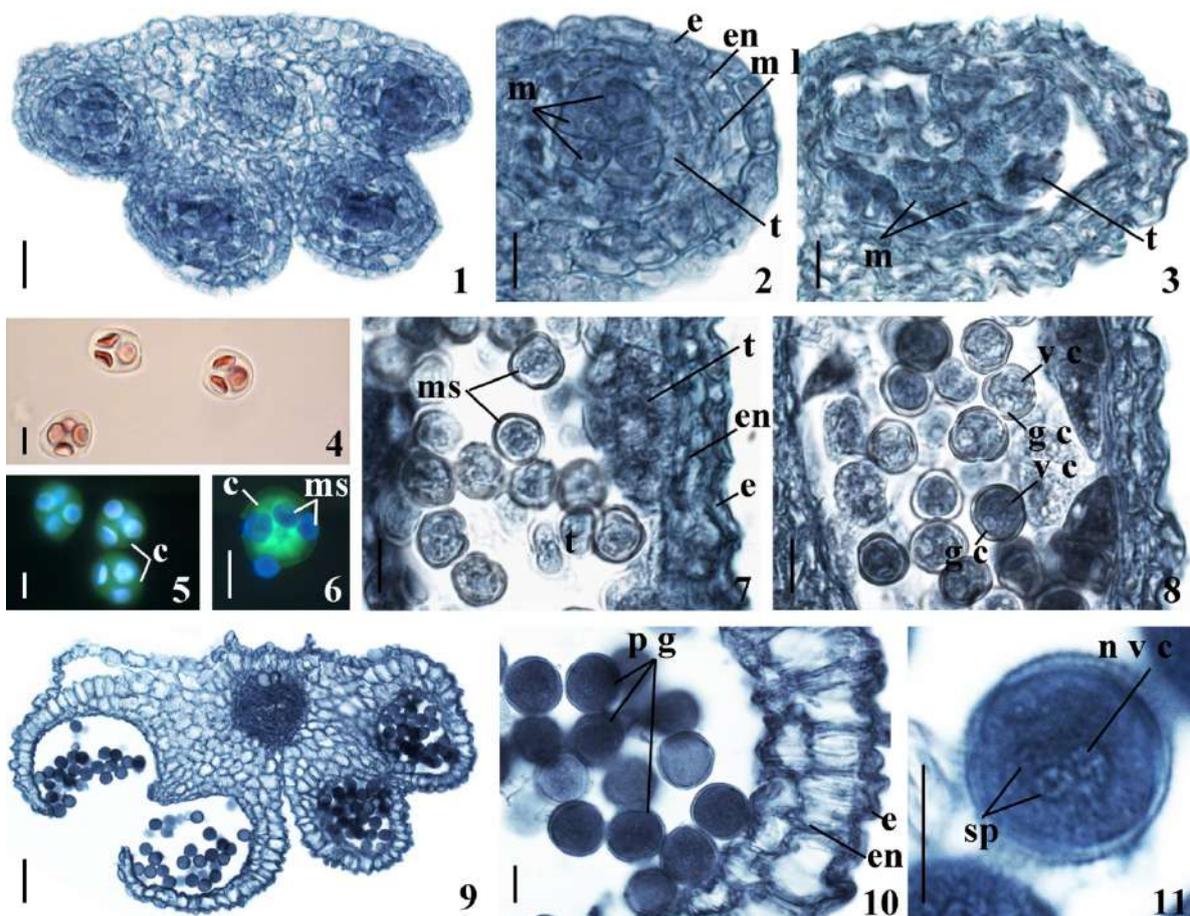


Рисунок 7 - Строение пыльника и развитие мужского гаметофита у *Boecheira falcata*. 1 – сформированный пыльник, 2-6 – строение стенки пыльника на стадиях: микроспорцитов (2), профазы 1-ого деления мейоза (3), 4 – 5 - тетрады микроспор, 6 – выход микроспор из каллозной оболочки (5, 6 – флуоресцентное окрашивание на каллозу анилиновым синим), 7-8 – строение стенки пыльника на стадии микроспор (7) и 2-клеточного пыльцевого зерна (8), 9 – зрелый пыльник и его вскрывание, 10 – строение стенки зрелого пыльника, 11 – зрелое 3-клеточное

пыльцевое зерно. с – каллоза, е – эпидерма, ен – эндотеций, gc – генеративная клетка, m – микроспороцит, ml – средний слой, nuc – ядро вегетативной клетки, pg – пыльцевое зерно, sp – спермий, t – тапетум, vc – вегетативная клетка. Шкала 20 мкм (1, 6), 10 мкм (2-5, 7, 8, 10, 11), 50 мкм (9).

характерна протандрия, то есть микроспороциты закладываются в пыльниках (при длине почек 0,29–0,33 мм) довольно рано, когда в завязях еще нет семязачатков (Taskin et al., 2009). Пыльник четырехгнездный, стенка пыльника на стадии микроспороцита четырехслойная, она состоит из эпидермиса, эндотеция, среднего слоя и тапетума (рис. 7.1–7.2). На стадии микроспорогенеза клетки тапетума сильно увеличиваются в размерах и становятся двухъядерными; средний слой начинает подвергаться лизису (рис. 7.3).

Микроспорогенез протекает по симультанному типу, в результате чего образуются тетрады микроспор (рис. 7.4, 7.5). Тетрады распадаются на отдельные микроспоры, которые далее делятся с образованием вегетативных и генеративных клеток (рис. 7.6–7.8). В это время начинается разрушение клеток тапетума, а по мере созревания пыльцевого зерна тапетум полностью лизируется, а клетки эндотеция, наоборот, увеличиваются и приобретают фиброзные утолщения на своих стенках (рис. 7.9, 7.10). Зрелые пыльцевые зерна 3-клеточные, состоят из крупной вегетативной клетки и 2-х спермиев, образующихся в результате деления генеративной клетки (рис. 7.11). Во всех пыльниках пыльцевые зерна хорошо сформированы, содержат плотную цитоплазму и 3 клетки (рис. 7.11); различия в размерах пыльцевых зерен внутри пыльника отсутствуют; встречаются единичные пустые мелкие пыльцевые зерна, которые, вероятно, погибли на ранних стадиях развития. Эти наблюдения свидетельствуют о высокой фертильности пыльцевых зерен у исследованных нами растений *Boechera falcata*.

Цитологические и морфологические исследования, описанные в этом разделе, необходимы для понимания клеточных процессов, происходящих на каждой исследуемой стадии и для сравнительной характеристики растений с

нарушениями развития гаметофитов относительно растений с нормальным фенотипом.

2.3 Идентификация генов, влияющих на развитие гаметофита

Развитие зародышевого мешка *Polygonum*-типа у модельного растения *Arabidopsis* дикого типа довольно хорошо изучено с точки зрения цитологии (Misra, 1962; Полякова, 1964; Webb, Gunning, 1990; 1994; Mansfield, et al., 1991; Murgia et al., 1993; Schneitz et al., 1995; Christensen et al., 1997 и наши цитолого-эмбриологические исследования), было выделено семь морфологически различных стадий, FG1 – FG7 (Christensen et al., 1997). Однако сообщений о мутантах с нарушением генов, влияющих на развитие гаметофитной фазы (гаметофитных мутантов) арабидопсиса, долгое время, практически, не было. Фактически, до середины 1990-х годов был описан только один мутант с нарушением гена гаметофитного фактора 1 (*gfl*) (Redei, 1965). Отсутствие знаний генетических основ развития гаметофита привело Джека Хеслопа-Харрисона к предположению, что гаметофит — это «забытое поколение» (Heslop-Harrison, 1979). За последние два десятилетия появились новые генетические и биоинформатические инструменты, которые позволили использовать методы функциональной генетики и геномики для анализа развития женского гаметофита и идентификации конкретных, задействованных в его формировании генов. Значительный прогресс был достигнут благодаря использованию инсерционного мутагенеза, являющегося ценным инструментом исследований с помощью прямой и обратной генетики (Brukhin et al., 2005b; 2011). Например, с использованием разработанных систем встраивания транспозонов с низким числом копий в случайных положениях генома, были созданы ценные коллекции мутантов арабидопсиса. Такие системы, помимо разнообразных фенотипов, обеспечивают наличие физической метки, указывающей местонахождение мутации, которую можно использовать для картирования, а также в качестве отправной точки для секвенирования области в

Таблица 1 - Типы обнаруженных мутаций женского гаметофита у модельных растений, арабидопсиса и кукурузы.

Класс мутантов	Название мутанта	Ссылка	
Митотический	<i>gfl1</i>	Redei, 1965; Christensen et al., 1997	
	<i>Ig*</i>	Guo et al., 2003; Kermicle, 1971; Huang and Sheridan et al., 1996	
	<i>prl</i>	Springer et al., 1995	
	<i>hdd</i>	Moore et al., 1997	
	<i>gfa4, gfa5</i>	Feldmann et al., 1997	
	<i>ada, tya</i>	Howden et al., 1998	
	<i>fem2, fem3, fem5,</i> <i>fem9-fem16, fem 18-fem26,</i> <i>fem 29-fem31, fem33-fem 38</i>	Christensen et al., 2002	
	<i>hma, ana</i>	Moore, 2002	
	<i>cki1</i>	Drews et al., 1998; Hejatko et al., 2003	
	<i>apc2</i>	Capron et al., 2003	
	<i>nomega</i>	Kwee and Sundaresan, 2003	
	<i>rbr1</i>	Ebel et al., 2004	
	<i>agp18</i>	Acosta-Garcia and Vielle-Calzada, 2004	
	<i>swa1</i>	Shi et al., 2005	
	<i>eda1-eda23</i>	Pagnussat et al., 2005	
	<i>kup, ast</i>	Brukhin et al., 2011	
	Кариогамный	<i>gfa2, gfa3, gfa7</i>	Feldmann et al., 1997; Christensen et al., 1998
		<i>pri, nan</i>	Moore, 2002
		<i>eda24-eda41</i>	Pagnussat et al., 2005
<i>amn, aps</i>		Brukhin et al., 2011	
Целлюляризации	<i>gfa2, gfa3, fem4</i> <i>fem6-fem8, fem11</i> <i>fem13, fem 15</i> <i>jum, wlg, nja, dam</i>	Christensen et al., 1998; 2002 Christensen et al., 2002 Moore, 2002	
	Дегенеративный	<i>fem1</i>	Feldmann et al., 1997
		<i>fem14, cgfa2</i>	Christensen et al., 2002
Оплодотворения	<i>nan</i>	Moore, 2002	
	<i>yar</i>	Brukhin et al., 2011	
	<i>fer</i> <i>srn</i> <i>une1-une18</i> <i>zmeal1*</i>	Moore, 2002; Huck et al., 2003 Rotman et al., 2003 Pagnussat et al., 2005 Márton et al., 2005	
Гаметофитный материнский эффект	<i>fie</i>	Chaudhury et al., 1997	
	<i>fis1 (mea), fis2, fis3 (fie)</i>	Ohad et al., 1996	
	<i>mea</i>	Grossniklaus et al., 1998	
	<i>mell*</i>	Evans and Kermicle, 2001	
	<i>prl</i>	Holding and Springer, 2002	
	<i>cap1, cap2</i>	Grini et al., 2002	
	<i>ctr1</i>	Christensen et al., 2002	
	<i>zal, ash, aya, kem</i>	Moor, 2002	
	<i>dme</i>	Choi et al., 2002	
	<i>bga</i>	Pischke et al., 2002	
	<i>mee1-mee70</i>	Pagnussat et al., 2005	
	<i>lpat2</i>	Kim et al., 2005	
	<i>did</i>	Brukhin et al., 2011	

мутанты, обозначенные *, были изолированы из *Zea mais*, остальные мутанты были получены у *Arabidopsis thaliana*

районе инсерции (Sundaresan et al., 1995, Springer et al., 1995; Moore et al. al., 1997, Parinov et al., 1999, Zhang et al., 2003, van Enckevort et al., 2005; Brukhin et al., 2011).

В течение последних десятилетий в крупномасштабных проектах по инсерционному мутагенезу с использованием либо транспозонов, либо инсерций Т-ДНК, включая наши исследования, были произведены новые гаметофитные мутанты и идентифицированы локусы, необходимые для развития мужских и женских гаметофитов (Moore et al., 1997; Feldmann et al. al., 1997; Howden et al., 1998; Bonhomme et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2002; Grini et al., 1999; 2002; Ohad, et al., 1999; Moore, 2002; Lalanne et al., 2004; Pagnussat et al. , 2005; Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011). Тем не менее, идентификация генов, которые управляют функцией и развитием женского гаметофита и семени, далека от завершения.

Полученные в крупномасштабных скринингах гаметофитные мутанты затрагивают все стадии развития гаметофита. В развитии и функционировании зародышевого мешка покрытосеменных принимает участие большое количество разнообразных клеточных процессов. Большинство мутантов было получено у арабидопсиса, но некоторые из них также изолированы из кукурузы (табл. 1). Исходя из описанных выше стадий развития женского гаметофита, его формирование можно разделить на следующие этапы: (1) спецификация мегаспор, (2) инициация мегагаметогенеза, (3) митотическая прогрессия, (4) установление полярности гаметофита, (5) миграция полярных ядер, (6) слияние полярных ядер (кариогамия), (7) целлюляризация, (8) гибель антиподальных клеток и (9) дегенерация синергид. Зрелый женский гаметофит играет важную роль в таких процессах развития, как: (1) привлечение и проведение пыльцевых трубок, (2) принятие пыльцевых трубок, (3) миграция сперматозоидов, (4) плазмогамия во время двойного оплодотворения, (5) кариогамия мужских и женских ядер и (6) влияние материнских тканей спорофита на раннее развитие зародыша и эндосперма. Гаметофитные мутанты, обнаруженные на сегодняшний день, демонстрируют дефект одного или нескольких из перечисленных процессов. Они были классифицированы в соответствии с нарушением основной функции, которое

наблюдается при их развитии (Brukhin et al. 2005a; 2011; Brukhin and Baskar, 2019) (табл. 1).

2.3.1 Инсерционный мутагенез для получения мутантных линий, влияющих на репродукцию растений.

Поскольку у большинства растений фертильность снижается после химического мутагенеза, последний не является подходящим методом для идентификации мутантов с нарушением развития женского гаметофита с помощью скрининга на полустерильность. Новая эра генетики гаметофитов началась с появления методик для инсерционного мутагенеза. Эти методы не вызывают общего снижения фертильности и позволяют определять коэффициенты сегрегации путем простого анализа отбора маркерных генов (присутствующих в инсерционном элементе, т.е. T-ДНК или транспозонах) (Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011).

Мы использовали систему генных ловушек на основе *Ac/Ds* транспозонов для выявления мутаций, влияющих на гаметофитную фазу жизненного цикла растений (Brukhin et al., 2011). Данная методика инсерционного мутагенеза была описана у Sundaresan et al. (1995) для дикого типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. var. Ландсберг (прямостоячий мутант: Ler). Мутагенез инициировали путем скрещивания растений, гомозиготных по одному элементу *Ds*, с растениями, гомозиготными по иммобилизованному элементу *Ac* (рис. 8 и 9). Первое поколение устойчивых к селективным агентам растений проращивали в горшках, позволяя им самоопыляться (рис. 10). Семена растений поколения F1 были собраны и подвергнуты дальнейшему скринингу. Транспозанты идентифицировали с помощью скрининга проростков поколения F2 на 0,7% агаризованной среде Мурашиге-Скуга (MS), pH 5,7, содержащей канамицин и альфа-нафталинацетамида (NAM) (см. главу Экспериментальные процедуры). T-ДНК, несущие как элемент *Ds*, так и элемент *Ac*, содержали ген *индолацетамидгидролазы (IAAH)*. Это позволило проводить отбор растений, не

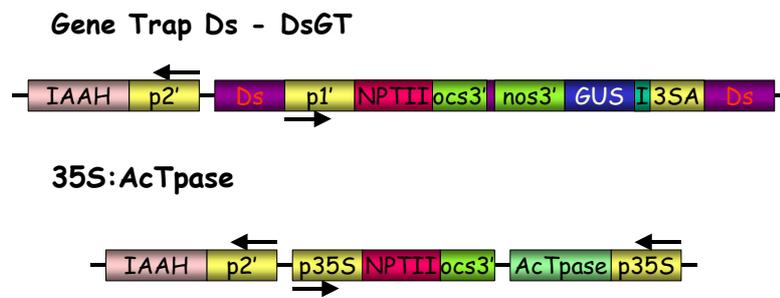


Рисунок 8 - Схематические конструкции транспозонов. Диаграммы элементов *Ac* и *Ds*, включенных в Т-ДНК. *IAAH*, ген *индолацетамидгидролазы* (придает чувствительность к нафталинацетамиду, NAM); *NPTII*, ген *неомицинфосфотрансферазы* (придает устойчивость к канамицину); *GUS*, репортерный ген *b-глюкуронидазы*; 3SA, тройной акцептор; 1', 2' промоторы Т-ДНК; *ocs 3'*, *nos 3'* терминаторы транскрипции Т-ДНК; 35S, минимальный промотор (транкирование -46 вирусного промотора 35S). *DsG* - транспозон-ловушка гена.

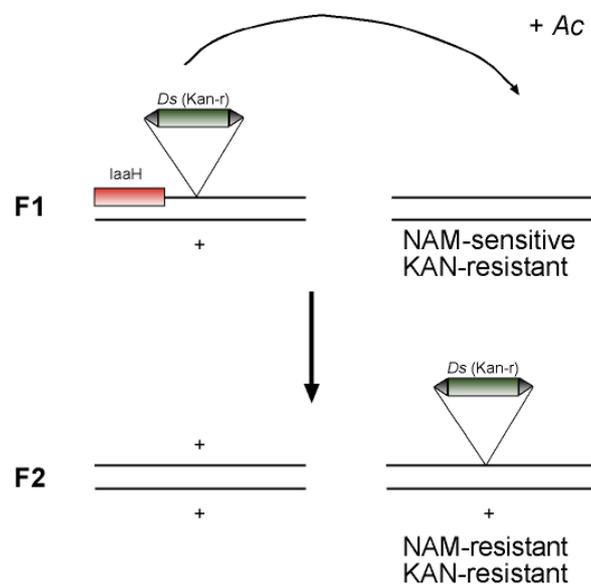


Рисунок 9 - Схема мобилизации и иммобилизации *Ds*-элемента при несцепленной транспозиции



Рисунок 10 - Скрининг гибридов поколения F1 с использованием системы полимерных трубок Arason

содержащих ген *IAAH*, с использованием NAM, следовательно, отбор растений, не содержащих T-ДНК. *Ds*-элемент содержал ген устойчивости к канамицину (*nptII*), что позволяло отселектировать растения с реинсерцией транспозона *Ds* на некотором расстоянии от донорского локуса. Вставка в другую хромосому или рекомбинация способствовало удалению *Ds* из донорского локуса, тем самым обогащая события несцепленной транспозиции. Поскольку данная процедура также осуществляет селекцию против *Ac* элемента, новое положение *Ds* становится стабилизированным. *Ds*-элементы несут репортерный ген β -глюкуронидазы (*GUS*), перед которым в конструкторе вставлены множественные акцепторные сайты сплайсинга, позволяющие *Ds*-элементу вести себя как генная ловушка (GT – англ. Gene Trap) (Sundaresan et al., 1995; Springer et al., 1995). Ген-репортер (*GUS*) не имеет промотора, поэтому его экспрессия может происходить только при условии регуляции промотором гена работающего гена, нарушенного *Ds* - элементом и только при условии, если *GUS* встраивается в транскрибируемую хромосомную

область, создавая слияние транскрипции, то есть в рамках считывания нарушенного гена. Эта функция позволяет обнаружить паттерн экспрессии меченого гена, когда *Ds*-элемент встраивается в ген в правильной ориентации. На практике, однако, только 17% созданных нами линий генных ловушек показали *GUS*-положительное окрашивание (Brukhin et al., 2011). Отобранные растения проращивали. Для скрещиваний закрытые цветочные почки с уже открывающимися пыльниками эмамулировали за 1 или 2 дня до опыления.

В отличие от использования меченого инсерционного мутагена применение для идентификации гаметофитных мутантов нескольких сцепленных маркеров, встроенных в несущие их хромосомы, также будет демонстрировать некоторую степень нарушения коэффициента сегрегации (Grini et al., 1999). Однако помимо наличия маркера для прямой оценки, инсерционные мутагены имеют преимущество в том, что они «метят» мутации таким образом, что геномные последовательности, фланкирующие вставку, могут быть определены с помощью простых методов, основанных на ПЦР (Sundaresan et al., 1995; Grossniklaus et al., 1998). Недостатком является то, что инсерционные мутагены могут вызывать хромосомные перестройки, которые иногда затрудняют анализ этих мутантов (May, Martienssen, 2003; Page et al., 2004; Brukhin et al., 2011).

Нами было произведено 2511 GT (англ. Gene Trap) мутантных линий, каждая из которых содержала предположительно одну независимую инсерцию *Ds*. Мы провели скрининг потомства, полученного в результате самоопыления этих линий, на наличие гаметофитных мутантов. Из всех полученных GT линий мы обнаружили 54 линии (2%) с нарушением фертильности, то есть с уменьшенным набором семян в плодах.

2.3.2 Двухступенчатый скрининг, направленный на изоляцию гаметофитных и эмбриолетальных мутантов

Законы Менделя применимы к признакам, проявляющимся в диплоидном спорофите, в котором рецессивная мутация будет расщепляться в поколении F2 в

соотношении 3:1. Напротив, мутации в генах, влияющих на гаплоидный гаметофит, предотвращают их передачу через яйцеклетку и/или сперматозоид, что приводит к искаженному, менделевскому коэффициенту сегрегации (Brink, MacGillivray, 1924; Brukhin et al., 2005a). Полностью пенетрантная мутация, влияющая на оба гаметофита, совсем не будет передаваться следующему поколению в связи с летальностью гаметофитов. Однако частично пенетрантные мутации или мутации, затрагивающие только один пол, могут передаваться последующим поколениям и существовать в гетерозиготном состоянии в спорофитах. Гаметофитные мутанты довольно трудно идентифицировать, поскольку половина пыльцы и половина зародышевых мешков несут аллель дикого типа, поэтому растения кажутся фертильными. В то время как мужские гаметофитные мутанты производят достаточное количество пыльцы дикого типа для оплодотворения всех семязачатков, женские гаметофитные мутанты, как ожидается, будут полустерильными, поскольку половина семязачатков не образует семян. Наполовину выполненный плод выглядит как обычный, поэтому его необходимо вскрыть для оценки степени снижения завязываемости семян.

Стратегия двухэтапного скрининга для идентификации гаметофитных мутантов основывается на (i) снижении фертильности плодов, то есть уменьшении количества зрелых семян в стручках за счет их абортивности и (ii) нарушении расщепления (сегрегации) в F₂ проростках арабидопсиса, пророщенных на питательной среде, содержащей селективные маркеры, канамицин и NAM (n устойчивых / n чувствительных к канамицину и NAM), либо неспособности семязачатков к дальнейшему развитию. Такая стратегия может быть использована для идентификации репродуктивных мутантов из коллекций, полученных с помощью инсерционной системы *Ac/Ds* транспозонов. Отклонение от менделевского отношения сегрегации 3:1 указывает на то, что либо гомозиготные зиготы (соотношение сегрегации 2:1), либо гаплоидные гаметофиты являются летальными (рис. 11). Для секс-специфичной, полностью пенетрантной гаметофитной мутации ожидается сегрегация с соотношением нормальных семязачатков (или семян) к абортированным в завязи (или плоде) равной примерно

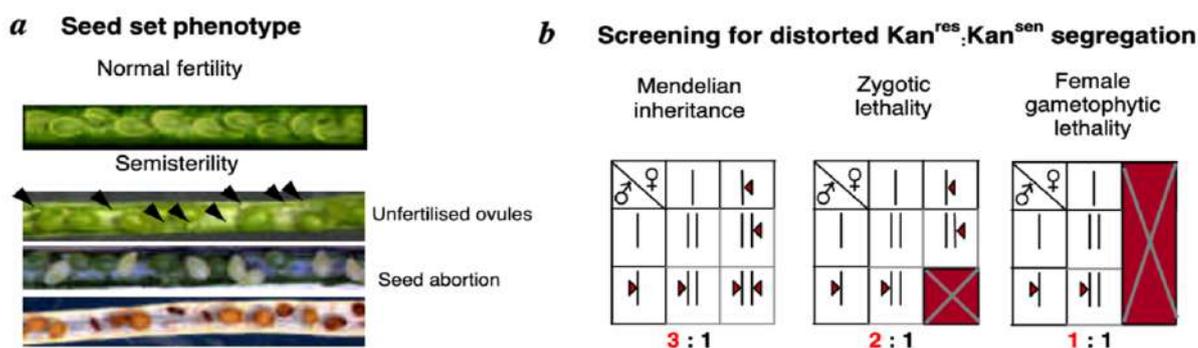


Рисунок 11 - Стратегия двухэтапного скрининга, направленного на выявление гаметофитных мутантов, полученных методом инсерционного мутагенеза с использованием модифицированных транспозонов системы *Ac/Ds*. а) На первом этапе оценивают уменьшение завязываемости семян в стручках. У растения, гетерозиготного по гаметофитной летальной мутации, около половины семязачатков (50%) не увеличиваются в размере и не развиваются в семя. У растений, гетерозиготных по зиготической эмбриолетальной мутации, около 25% семян погибают, тогда как гаметофитная мутация с материнским эффектом обнаруживает 50% абортивных семян, что можно выявить на зеленых или сухих стручках. б) На втором этапе коэффициент сегрегации анализируется с помощью встроенного в транспозон доминантного маркера. Если инсерция с прерыванием какого-либо гена не влияет на трансмиссию, то она наследуется в следующем поколении в соотношении 3: 1, если вызывает эмбриональную летальность 2: 1, а если имеет место летальность женского гаметофита 1: 1 (Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011). Kan^{res} – устойчивые к канамицину; Kan^{sen} – чувствительные к канамицину (Brukhin et al., 2005a).

1:1. Однако часто передача мутации снижается через оба гаметофита, что приводит к более сильному искажению коэффициента сегрегации. Чтобы определить степень поражения каждого гаметофита, проводят реципрокные скрещивания с диким типом для измерения эффективности передачи через каждый пол, так называемый трансмиссионный анализ (Moore et al., 1997; Howden et al., 1998; Brukhin et al. 2005a; Brukhin et al., 2011). В наших исследованиях летали гаметофитов

идентифицировали по наличию более 30% неразвитых семязачатков в зеленых стручках. Жизнеспособное потомство тестировали на искажение коэффициента сегрегации на питательной среде, содержащей канамицин. Летальность гаметофита или зародыша должна приводить к уменьшению передачи Kan^r в диапазоне от 1:1 до 2:1, устойчивых к канамицину, к чувствительным проросткам.

Если для идентификации гаметофитных мутантов используется только отклонение коэффициента сегрегации, то при этом обнаруживаются мутации, затрагивающие как один, так и оба гаметофита, мужской и женский. Применение же двухэтапного скрининга позволяет выявить настоящие гаметофитные мутанты, поскольку все другие причины снижения фертильности, такие как частично пенетрантные спорофитные мутанты, неблагоприятные условия окружающей среды или реципрокные транслокации, не вызывают отклонения от нормальной менделевской сегрегации 3:1 (Moore et al., 1997; Page and Grossniklaus, 2002; Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al. 2011).

Проведенный скрининг всей популяции GT линий, направленный на поиск нарушенного соотношения сегрегации гена Kan^r , присутствующего в *Ds* элементе, обнаружил, что 31% GT линий давали проростки, из которых все или почти все были устойчивы к канамицину. Это может быть связано либо с гомозиготностью *Ds* вставки, либо со встраиванием более одного *Ds* элемента на геном. 40% линий обнаружили отношение расщепления Kan^r/Kan^s около 3:1, что соответствует нормальному соотношению расщепления по Менделю. 19,5% линий демонстрировали пониженные коэффициенты расщепления в диапазоне от 2:1 до 2,5:1, что, вероятно, является результатом рецессивного, зиготического эмбрионального летального фенотипа. 9,5% GT линий демонстрировали искаженные коэффициенты сегрегации от 2:1 до 0,14:1. Последнее могло быть вызвано частичным или полным снижением передачи инсерции *Ds* через один или оба пола. Чтобы узнать, какие из полустерильных линий GT обнаруживали abortивность семязачатков и/или семян из-за снижения передачи через мужские и/или женские гаметофиты, мы повторно исследовали 54 предварительно отобранных линии с уменьшенным набором семян в плодах на предмет искажения

коэффициента сегрегации. Наконец, было идентифицировано 12 GT линий, которые сочетали полустерильный фенотип с нарушением коэффициента сегрегации, что согласовывалось с предсказанием гаметофитной мутации. Это соответствует 0,48% от всех проверенных GT линий. Данная частота соответствует диапазону гаметофитных летальных линий, полученных в других скринингах, направленных на выявление мутаций гаметофитов (Feldmann et al., 1997; Moore et al., 1997; Howden et al., 1998; Bonhome et al., 1998; Lalanne et al., 2004; Pagnussat et al., 2005). Хромосомные последовательности, фланкирующие вставки транспозонов, были идентифицированы и физически картированы на последовательности генома *Arabidopsis thaliana*. Как ни странно, сайты инсерции часто были связаны с хромосомными перестройками, что затрудняло отнесение мутантных фенотипов к конкретному гену. На основании цитологических исследований, определивших терминальное прерывание развития зародышевых мешков, мы классифицировали обнаруженные мутанты как митотические, кариогамные, материнские или дегенеративные и эмбриолетельные фенотипы.

Отселектированные мутанты с нарушением гаметофитных функций мы назвали в честь богов или богинь из различных пантеонов, чье влияние, согласно легенде, распространяется на плодовитость и размножение.

Рассмотрим характеристику нескольких гаметофитных мутантов из полученной коллекции нокаутов. Морфологическую характеристику проводили на семязачатках и семенах, просветленных хлоралгидратом, в соответствии с протоколом Yadegari et al. (1994).

Два мутанта, *kupalo* и *astlik*, были отнесены к классу, характеризующемуся дефектами митотической прогрессии, то есть в одном или нескольких из трех митотических делений (на стадиях от FG1 до FG5, согласно Christensen et al., 1997), образующих зрелый зародышевый мешок (Brukhin et al., 2005a; 2011). Первый мутант был назвали *kupalo* (*kup*) в честь славянского бога трав, колдовства, любви и летнего солнцестояния (День Ивана Купалы). Соотношение сегрегации $Kan^r:Kan^s$ проростков, полученных от растений *kup/KUP*, составляло 1,04:1 (табл. 2). Передача *Ds* через женский гаметофит составила всего 40 %, а мужская

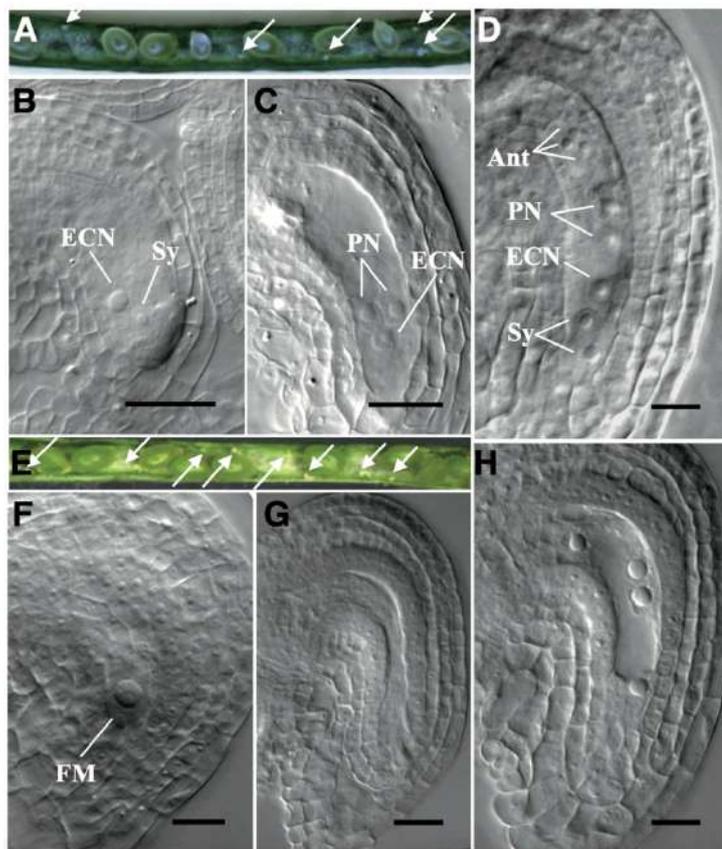


Рисунок 12. Фенотипы зародышевого мешка и фертильность плодов у мутантов митотического класса *kupalo* и *astlik*. (A-C) *kupalo*, (D) дикий тип, (E-H) *astlik*. (A) Стручок, содержащий нормальные семена и неоплодотворенные семязачатки (стрелки). (B) Зародышевый мешок с яйцеклеткой и дефектной клеткой синергиды. (C) Зародышевый мешок с яйцеклеткой и не слившимися полярными ядрами, ядра синергид отсутствуют. (D) Семиклеточный 8-ядерный зародышевый мешок дикого типа, содержащий яйцеклетку, две синергиды, два неслившихся полярных ядра и три антиподальные клетки. (E) Стручок, содержащий нормальные семена и неоплодотворенные семязачатки (стрелки). (F) Функциональная мегаспора, прекратившая развитие. (G) Неразвившийся семязачаток с дегенерировавшим зародышевым мешком, при этом интегумент продолжает рост. (H) Семязачаток с аномальным неразвившимся зародышевым мешком, остановившим развитие на четырехъядерной стадии. ECN, ядро яйцеклетки; FM — функциональная

мегаспора; PN, полярные ядра; Ant, антиподы; Sy, синергиды. Масштабная линейка, 10 мкм (Brukhin et al., 2011).

трансмиссия снизилась до 68 % (табл. 2). Анализ мутантного фенотипа *kup* показал, что в зрелых стручках 42% семязачатков были неоплодотворенными (табл. 2), оставались маленькими желтоватыми и не формировали семян (рис. 12А, стрелки). Цитологические наблюдения под дифференциально-интерференционно-контрастной (DIC) оптикой показали, что большинство яйцеклеток (32%) задерживают свое развитие на стадии FG5 (рис. 12В). На этой стадии в семязачатках дикого типа синцитиальный восьмиядерный зародышевый мешок целлюляризируется с образованием семиклеточного женского гаметофита, содержащего три антиподы, две синергиды, яйцеклетку и двудерную центральную клетку (рис. 12D). 5% семязачатков останавливали развитие на стадиях FG3 – FG4, т. е. у мутанта обнаруживались аномалии во время фазы деления ядер между двух- и восьмиядерной стадиями. 2% зародышевых мешков останавливали свое развитие на стадии FG1 во время первого митотического деления функциональной мегаспоры, а 3% семязачатков достигли стадии FG6, соответствующей зрелому зародышевому мешку (рис. 15В), но дальше они не развивались. Интересно, что некоторые семязачатки в *kup* обнаруживают зародышевые мешки с дефектными (рис. 12В) или отсутствующими (рис. 12С) синергидами и аномалиями полярных ядер (рис. 12С).

Мутант *astlik* (*ast*) был назван в честь армянской богини любви и плодородия Астхик. Соотношение расщепления $Kan^r:Kan^s$ в потомстве *ast/AST* растений составило 1,66:1 (табл. 2), что характерно для сочетания зиготической и гаметофитной летальности. В зрелых стручках мутанта *ast* 51% семязачатков были неоплодотворенными (рис. 12Е, стрелки). Большинство из них (40% от общего числа) останавливали свое развитие до первого митотического деления функциональной мегаспоры на FG1 (рис. 12F), тогда как небольшое их количество развивалось до стадии FG2 (2%) или FG3 (9%), соответствующих четырехядерному зародышевому мешку

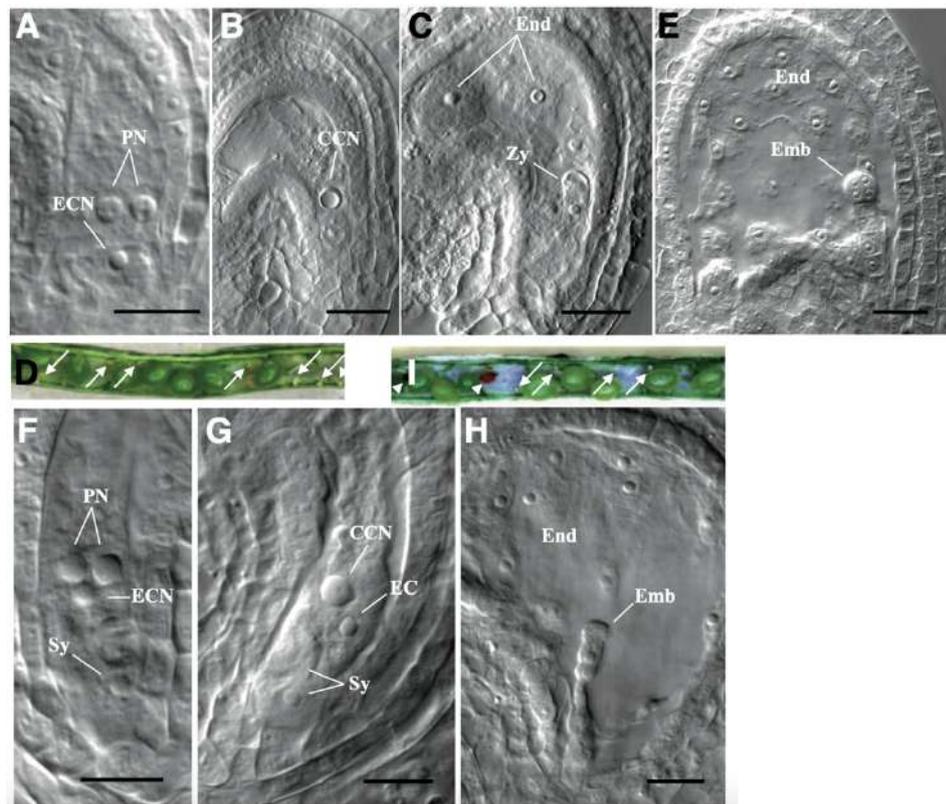


Рисунок 13 - Зародышевые мешки и семена в плодах, характеризующие фенотипы мутантов класса кариогамии *amon* и *apis*. (A-E) *amon*, (F-I) *apis*. (A, F) Зародышевый мешок с неслившимися полярными ядрами центральной клетки. (B) Прекративший развитие зародышевый мешок со слившимися полярными ядрами центральной клетки. (C) Зародышевый мешок с зиготой, имеющей удлиненную форму и аномальную вакуолизацию, окруженной аномальными ядрами эндосперма. (E) Нормальное семя дикого типа с зародышем на стадии октанта и нуклеарным эндоспермом – семя из того же стручка, что и дефектные семязачатки, показанные на (B, C). (D, I) Стручки, содержащие как нормальные семена, так неоплодотворенные семязачатки (стрелки) и абортывшие семена (стрелки), которые остановили развитие вскоре после оплодотворения. (G) Зародышевый мешок с яйцеклеткой, синергидами и необычно крупным ядром центральной клетки. (H) Сморщенный, дегенерирующий зародыш, и нуклеарный эндосперм с мелкими и недифференцированными ядрами. CCN, ядро центральной клетки; EC, яйцеклетка; ECN, ядро яйцеклетки; Emb, зародыш; End, эндосперм; PN, полярные

ядра; *Sy*, синергид; *Zy*, зигота. Масштабная линейка, 10 мкм в (А-С) и (F-H); 25 мкм в (E).

(рис. 12H, рис. 15B). Несмотря на эти аномалии, интегументы продолжали увеличиваться в размере, при этом в зрелых стручках часто наблюдались дефектные семязачатки, как показано на рис. 12G, внутри которых присутствовали остатки дегенерировавшего зародышевого мешка.

Мутанты *amon* (*amn*) и *apis* (*aps*) демонстрировали нарушение кариогамии, то есть процесса слияния полярных ядер. Во время нормального развития эти ядра мигрируют от противоположных полюсов зародышевого мешка к центру, где они сливаются перед оплодотворением, образуя гомодиплоидное ядро центральной клетки. Характерной чертой многих кариогамных мутантов является гаметофитный материнский эффект с последующей абортивностью семян (Moore et al., 1997; Brukhin et al., 2011).

Мутант *amon* был назван в честь египетского бога плодородия Амóна. При самоопылении потомство гетерозиготных мутантных растений *amn/AMN* расщепляется в соотношении $Kan^r:Kan^s = 1,13:1$. Зрелые плоды гетерозиготных растений *amn/AMN* содержали 59% нормальных семян, 36% светлых неоплодотворенных семязачатков и 5% темных, абортированных на ранних стадиях развития семян (рис. 13D; таблица 2). Более 30% семязачатков содержали аномально увеличенные, неслившиеся полярные ядра (рис. 13A) или, если полярные ядра слились, центральное клеточное ядро начинало дегенерировать (рис. 13B). Мутантные семязачатки были обнаружены в стручках рядом с нормальными семенами, которые содержали либо зрелый зародышевый мешок, либо семя с зародышем на ранней стадии, который уже претерпел несколько делений вместе с делениями эндоспермома (рис. 13E). Таким образом, светлые неоплодотворенные семязачатки *amn* (36%) останавливают свое развитие между стадиями FG5 и FG6 (рис. 15B), в то время как темные, абортированные на ранних стадиях формирования семени (5%) прерывали свое развитие на зиготической стадии (рис. 13C) или после нескольких делений клеток зародыша.

Мутант *apis* (*aps*) был назван в честь египетского божества-быка, олицетворяющего плодovitость. Коэффициент сегрегации $Kan^r : Kan^s$ у потомства мутантов *aps/APS* составлял 0,32:1 (табл. 2), что указывает на то, что мутация затрагивает как женские, так и мужские гаметофиты, а также возможно вызывает эмбриональную летальность. Фенотипический анализ семян в зрелых плодах гетерозиготных растений *aps/APS* выявил 61% нормальных семян, 31% неоплодотворенных семязачатков и 8% семян, которые останавливали свое развитие на ранних стадиях (рис. 13I; 15B). Цитологический анализ показал, что у 31% остановивших свое развитие неоплодотворенных семязачатков зародышевые мешки имели не слившиеся полярные ядра на стадии FG5 (рис. 13 F) либо обнаруживали дефекты развития после формирования центральной клетки на стадии FG6 (рис. 13 G). 8% семян останавливали свое развитие вскоре после начала формирования семян (рис. 13 H, I стрелки). Это может быть связано с гаметофитным материнским эффектом, приводящим к гибели зародышей, когда мутантные женские гаметофиты время от времени способны к оплодотворению, но вызывают летальность семян. Другой причиной может быть зиготическая и эмбриональная летальность гомозиготных по данной мутации зародышей, которая вызывает абортивность семян. Однако последнее объяснение маловероятно, так как на основе экспериментально определенной эффективности трансмиссии (см. следующий раздел) ожидалось, что гомозиготных зародышей будет менее 0,5%. Поэтому, по всей видимости, причиной абортивности подавляющего большинства семян является гаметофитный материнский эффект мутации *aps*.

Семязачатки мутанта *yarilo* обнаруживали дегенерацию центральной клетки, яйцеклетки и синергид (рис. 14 A-C). Этот мутант был отнесен к дегенеративному классу, для которого характерна спонтанная аномальная дегенерация ядер при развитии зародышевого мешка, что оказывает критическое влияние на ядерную стабильность. Мутант *yarilo* (*yar*) был назван в честь славянского бога страсти и вождения. Мутант *yar* вызывает дегенерацию компонентов зародышевого

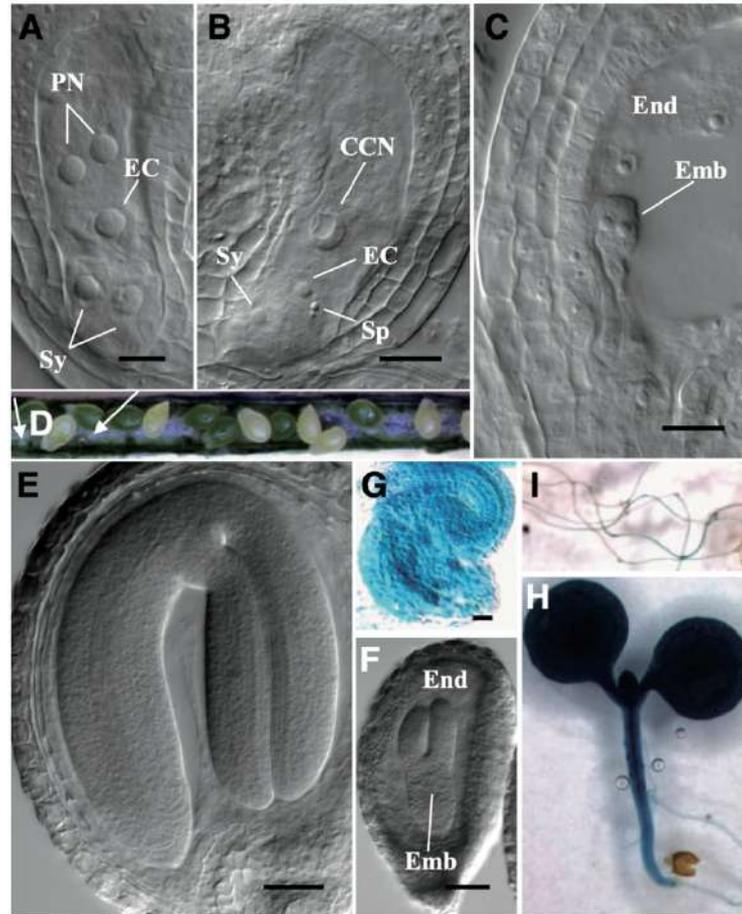


Рисунок 14 - Фенотипические особенности зародышевого мешка и семян у мутантов дегенеративного класса *yarilo* и класса гаметофитного материнского эффекта, ведущего к абортивности семян *didilia*. (A-C, I) *yarilo*, (D-H) *didilia*. (A) Яйцеклетка аномально большого размера, неповрежденные синергиды и полярные ядра, которые остаются неслившимися. (B) Дегенерирующее аномально крупное ядро центральной клетки и необычно маленькое дефектное ядро яйцеклетки с вошедшим в нее спермием. (C) Семя, остановившее свое развитие, зародыш с удлинённым суспензором и ядерный эндосперм демонстрируют признаки дегенерации. (D) Стручки, содержащие нормальные семена, бесплодные семязачатки (стрелки) и недоразвитые семена (белые). (E) Нормальное зрелое семя с полностью сформированным зародышем из того же стручка, что и на F. (F) Абортированное семя, содержащее остановивший развитие зародыш на торпедообразной стадии и недоразвитый эндосперм. (G-I) Экспрессия

репортерного гена *GUS* под промотором нарушенного гена: ген-репортер *GUS* включен в *Ds* транспозон, ему предшествовало несколько акцепторных сайтов сплайсинга, и он не имеет промотора, так что экспрессия *GUS* может происходить под промотором нарушенного транспозоном *Ds* гена только тогда, когда *GUS* встраивается в транскрибируемый участок хромосомы, создавая транскрипционное слияние. (G) Просветленный семязачаток с повсеместной экспрессией *GUS*. (H) Экспрессия *GUS* у 10-дневных проростков. (I) Экспрессия *GUS* в корнях двухнедельных проростков. CCN, центральное ядро клетки; EC, яйцеклетка; Emb, зародыш; End, эндосперм; PN, полярные ядра; Sy, синергида; Sp, спермии. Масштабная линейка, 10 мкм в (A-C) и (G) и 50 мкм в (E, F) (Brukhin et al., 2011).

мешка. Коэффициент сегрегации $Kan^r : Kan^s$ у этого мутанта, равен 0,3:1, что указывает на влияние обоих гаметофитов на наблюдаемый фенотип, что отмечалось и у *aps* (табл. 2). Зрелые стручки *uar* содержали 29% неоплодотворенных, остановившихся в развитии семязачатков, и 3% потемневших, недоразвитых семян. Микроскопические исследования мутанта *uar* обнаружили деформацию полярных ядер, особенно в районе ядрышек, наиболее заметном компоненте ядра в просветленных препаратах (рис. 14B). У мутанта *uar* 13% семязачатков содержали крупные дегенерирующие ядра, которые прекращали развитие непосредственно перед слиянием полярных ядер на стадии FG4–FG5 (рис. 14A) или вскоре после слияния на стадиях FG5–FG6 в 16% случаев (рис. 14B, рис. 15B). Нередко также наблюдалась дегенерация яйцеклетки, синергид и полярных ядер. Небольшая часть семян (3%) абортировалась на стадии двухклеточного зародыша (рис. 14C). Такой фенотип характерен для остановки развития семян, вызванной нарушениями материнского гаметофита, а также может быть связан с зиготической и зародышевой летальностью, которая, как ожидалось, возникает с частотой около 1,3%. Гаметофитные материнские эффекты ранее наблюдались как поздние фенотипы мутантов, принадлежащих к классу нарушения кариогамии и дегенерации, они также могут быть признаками класса митотических мутантов.

У мутанта *didilia* обнаружен гаметофитный материнский дефект, приводящий к абортивности семян, после оплодотворения. У мутантов с гаметофитным материнским эффектом фенотип проявляется только после оплодотворения (Grossniklaus et al., 1998; Brukhin et al., 2005a). Абортивность семян зависит лишь от аллелей, передающихся по материнской линии через женский гаметофит, независимо от отцовского вклада, эти аллели являются причиной остановки развития семян. Мутант *didilia* (*did*) был назван в честь славянской богини женской фертильности, деторождения, роста и плодородия. Зрелые плоды растений этой линии содержали 25% недоразвитых семян, которые были либо белыми в незрелых зеленых стручках (рис. 14D), либо потемневшими и сморщенными в зрелых плодах. В зрелых плодах наблюдали 5% семязачатков, которые остались неоплодотворенными (рис. 14D, стрелки). Данный фенотип, возможно, отражает неполную пенетрантность гаметофитной мутации. Цитологические наблюдения показали, что 5% неоплодотворенных семязачатков останавливали свое развитие на стадии зрелого зародышевого мешка (FG7), в то время как 25% семян прекращали формирование гораздо позже, в основном на поздних стадиях развития зародыша от сердечковидной до ранней торпеды (Рис. 14F). Остальные 70% семян были нормальными (рис. 14E, рис. 15B). В остановивших развитие семенах эндосперм также прекращал свое формирование на ранней ядерной стадии (рис. 14F).

2.3.3 Анализ эффективности генетической передачи (трансмиссионный анализ)

Эффективность передачи *Ds* – элемента через мужской (ТЕМ) и женский (ТЕФ) гаметофиты определяли с помощью реципрокных скрещиваний мутантных растений с растениями дикого типа (Howden et al., 1998; Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al. 2011). Чтобы выяснить эффективность женской трансмиссии (ТЕФ) мутантные растения опыляли пыльцой дикого типа арабидопсиса, и наоборот, для определения эффективности мужской трансмиссии (ТЕМ) растения дикого типа опыляли пыльцой мутанта. Коэффициент эффективности передачи рассчитывали,

как $Kan^r/Kan^s \times 100\%$; где Kan^r , – устойчивые к канамицину, а Kan^s - чувствительные к канамицину проростки соответственно.

Как было отмечено ранее, гаметофитные мутации обычно передаются через оба пола (Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al. 2011). Самоскрещивающееся потомство шести исследованных мутантов показало стабильное нарушение коэффициента сегрегации как минимум в трех-четыре поколениях, что позволяет предположить, что мутации в исследуемых линиях были связаны с инсерцией *Ds*. Однако изменение коэффициента сегрегации у потомства, полученного путем самоопыления, не дает представления о том, на какой пол влияет мутация. В основном мы уделяли внимание мутантам с пониженной фертильностью, ожидая, что у них будет наблюдаться дефект развития или функционирования женского гаметофита, однако оказалось, что мутанты также могут в некоторой степени затрагивать и мужской гаметофит.

Таблица 2 - Фенотип, сегрегационный и трансмиссионный анализы гаметофитных мутантов, а также нарушенные гены и их функции.

Мутант	Фенотип		Сегрегация				TEF	n семян	TEM	N семян	Инсерция <i>Ds</i>	Функция прерванного гена
	фертильности	п семян	$Kan^r:Kan^s$	п семян	P	P						
<i>kupalo</i>	58%N+42%UO	1302	1.04:1	161	0.81	40%	424	68%	275	At2g01070	PTM1-подобный белок	
<i>astlik</i>	49%N+51%UO	570	1.66:1	187	0.23	61%	46	98%	107	Делеция генов: At3g03030 At3g03040 At3g03050 At3g03060 <i>Ds</i> 3' конец: At1g75990	белок семейства F-box белок семейства F-box Целлюлозосинтазоподобный белок семейства АТФаз типа ААА Белок семейства АТФаз типа ААА Субъединица RPN3b протеасомы 26S EMBRYO DEFECTIVE 2719	
<i>amon</i>	59%N+36%UO+5%A	1030	1.13:1	194	0.39	56%	426	24%	31	At4g02700	Ауксин-индуцированный AIR9 в культуре корней	
<i>apis</i>	61%N+31%UO+8%A	1045	0.32:1	212	NA	5%	113	8%	232	At5g44520 <i>Ds</i> 5' конец: At2g34680 At2g01110	ТАТС-подобный белок, UNFERTILIZED EMBRYO SAC3	
<i>yarilo</i>	68%N+29%UO+3%A	1221	0.30:1	341	NA	15%	109	9%	146			
<i>didilia</i> (<i>apg2</i>)	70%N+5%UO+25%A	1010	1.05:1	254	0.71	34%	270	59%	195			
wt	93%N+6%UO+1%A	844 ^a	3:1 ^b	-	-	100%	100%	100%	---			

^a на основе данных

^b ожидаемые, идеальные значения

N- нормальные семена; A- abortированные семена; UO- неразвитые семязачатки. P-значение $\geq 0,05$ основано на ожидаемом коэффициенте сегрегации $Kan^r: Kan^s$ 1:1 для гаметофитной летальной мутации. NA, неприменимо для мутантов *yar* и *aps*, где соотношение сегрегации было намного меньше 1:1 из-за дефектной передачи через оба пола. Эффективность трансмиссии была рассчитана в соответствии с Howden et al. (1998): $TE=Kan^r/ Kan^s \times 100\%$; Kan^r – проростки, устойчивые к канамицину; Kan^s – проростки, чувствительные к канамицину; TEF- эффективность женской передачи, TEM- эффективность мужской передачи.

Для подтверждения сцепления *Ds* с фенотипом использовали от 100 до 400 и более растений из потомства каждой тестируемой линии. Косегрегационный анализ выявил полную косегрегацию *Ds* элемента, т. е. Kan^r , и мутантного

фенотипа. Эти исследования указывают на то, что вставки *Ds* – элемента ответственны за наблюдаемый полустерильный фенотип, либо тесно связаны с мутацией, ответственной за фенотип.

Как отмечено в таблице 2, все инсерции показали снижение трансмиссии через женский гаметофит, как и ожидалось, в диапазоне от 5% до 61% от пенетрантности аллели дикого типа. Однако, за исключением одного (*ast*), все остальные мутанты также показали пониженную трансмиссию *Ds* и через мужской гаметофит в диапазоне от 8% до 68% аллели дикого типа. Уровень снижения передачи *Ds* через мужские и женские гаметофиты коррелирует (коэффициент корреляции $R=0,72$), что указывает на то, что у этих мутантов, вероятно, затронуты некоторые основные клеточные функции, а не только процессы развития, специфичные для одного пола. Более того, сегрегационный анализ всех шести самоскрещивающихся мутантов не выявил гомозиготных растений. Это свидетельствует о том, что помимо гаметофитных дефектов, выявляемых у гетерозигот, гомозиготные мутанты, вероятно, зиготически или эмбрио летальны.

У мутантов *kup* и *ast* передача *Ds* через женский гаметофит составляла 40% и 61%, а мужская трансмиссия 68% и 98% соответственно (табл. 2). У *amn* и *aps*, мутантов с нарушением кариогамии, эффективность передачи *Ds* была сильно снижена как через мужские, так и через женские гаметофиты $TEF=56\%$, $TEM=24\%$ и $TEF=5\%$, $TEM=8\%$ соответственно (табл. 2). У мутанта *uar*, вызывающего дегенерацию центральной клетки, яйцеклетки и синергид, эффективность трансмиссии также была очень низкой через оба пола ($TEF=15\%$, $TEM=9\%$) (табл. 2). Мутант *did*, который демонстрировал материнский гаметофитный дефект, после оплодотворения, обнаруживал снижение трансмиссии как через женский ($TEF=34\%$), так и через мужской гаметофиты ($TEM=59\%$) (таблица 2).

Таким образом, проанализированные мутации затрагивают как мужские, так и женские гаметофиты, что подтверждает более ранние выводы о том, что секс-специфичные гаметофитные мутанты встречаются редко (Moore et al., 1997; Feldmann et al., 1997; Howden et al., 1998; Bonhomme et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2002; Grini et al., 1999; Moore, 2002; Lalanne et al., 2004; Boavida et al., 2009;

Brukhin et al., 2011). Это вполне ожидаемо, поскольку многие процессы при формировании мужского и женского гаметофитов сходны, и для развития обоих гаметофитов, во время гаплоидной фазы, необходима экспрессия множества важных генов.

2.3.4 Определение количества *Ds*-элементов в геноме каждой мутантной линии

Оценка количества *Ds*-элементов, присутствующих в геноме каждой линии, была необходимой для того, чтобы убедиться, что мутантный фенотип обусловлен инсерцией единственного *Ds*, поскольку множественные вставки *Ds* будут способствовать большому затруднению анализа. Определение количества *Ds* осуществляли с помощью метода геномного саузерн-блоттинга.

Как видно на рис. 15А, все исследованные линии мутантов содержали в своем геноме только один *Ds* элемент.

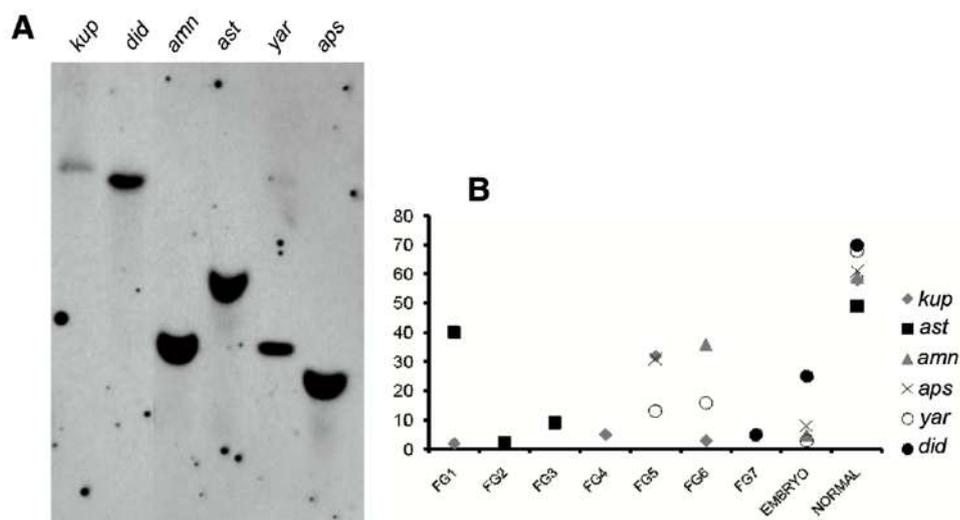


Рисунок 15 - Подтверждение наличия единственного *Ds* элемента в геноме каждой линии и сводный график фенотипической характеристики шести мутантов, затрагивающих развитие гаметофита. (А) Геномный Саузерн-блот указывает на присутствие одного *Ds* элемента в каждом тестируемом мутанте. Для Саузерн-блоттинга геномную ДНК, выделенную из соответствующих мутантов,

обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*, а для обнаружения левого пограничного фрагмента использовали меченный дигоксигенином 5'-*Ds*-зонд. (В) График суммирует процент семязачатков с терминальным фенотипом на определенной стадии развития для всех шести мутантов. Ось X – стадии женского гаметофита, на которых обнаружена остановка развития гаметофитов. Ось Y – процент остановившихся семязачатков/семян на каждой стадии и нормальных семян. FG1 — одноядерный женский гаметофит; FG2-F3, двуядерный женский гаметофит; FG4 — четырехъядерный женский гаметофит с неслившимися полярными ядрами; FG6 — семиклеточный женский гаметофит со слившимися полярными ядрами; FG7, четырехклеточный женский гаметофит: антиподальные клетки дегенерировали; FG8, трехклеточный женский гаметофит: одна из клеток синергид дегенерирует, а зрелый женский гаметофит состоит из яйцеклетки, центральной клетки и одной персистирующей клетки синергиды; согласно Christensen et al. 2007, (Brukhin et al., 2011).

2.3.5 Идентификация фланкирующих встроенный Ds-элемент последовательностей и анализ инсерционных линий из других коллекций

Хромосомные последовательности, фланкирующие встроенный *Ds* элемент, амплифицировали с помощью термической асимметричной перемежающейся ПЦР (англ. TAIL-PCR, thermal asymmetric interlaced), согласно методике Liu et al. (1995) с модификациями, описанными Grossniklaus и коллегами (1998), с использованием вложенных праймеров на концах *Ds*.

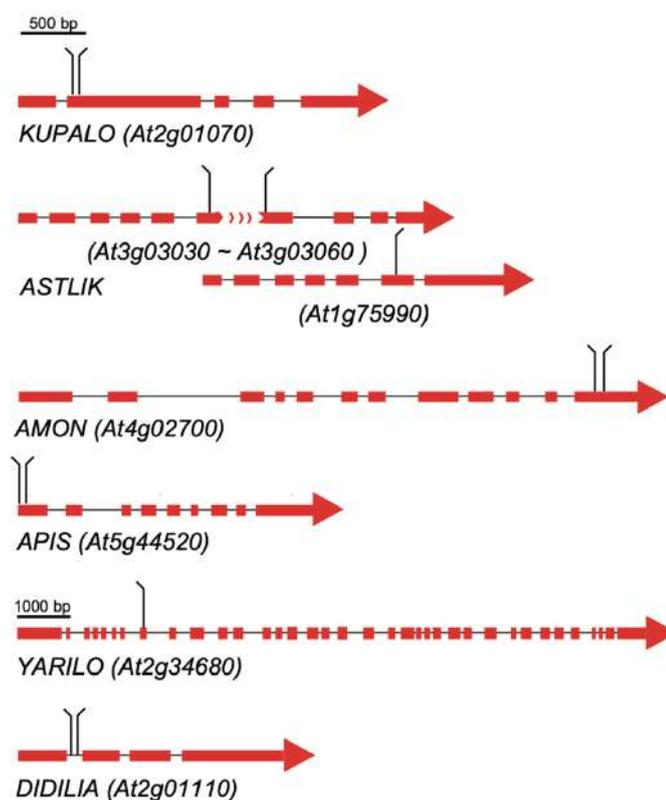


Рисунок 16 - Схематическое изображение сайтов инсерции *Ds*-элементов. Показана интронно-экзонная структура нарушенных генов. 3'- и 5'-концы включенных *Ds*-элементов обозначены вертикальными линиями слева и справа соответственно (Brukhin et al., 2011).

Для подтверждения того, что нарушенный ген является ответственным за наблюдаемый фенотип, проводили анализ инсерционных линий из других коллекций. Линии SALK были получены из Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, California, через Ноттингемский фондовый центр мутантов арабидопсиса NASC. Линии GT.100129, GT_5_48498, GT_5_74422, GT_5_105311, GT.100129 и SM_3.27652 были получены из Центра Джона Иннеса, Великобритания. Линия *unc3* была любезно предоставлена проф. В. Сундаресаном (Калифорнийский университет, Дэвис). Большинство исследованных инсерционных линий SALK и GT демонстрировали фенотип, характеризующийся редукцией завязывания семян. Линии были генотипированы для подтверждения нарушения изучаемого гена.

У мутанта *kup* фрагмент ДНК, фланкирующий элемент *Ds*, соответствовал второму экзону гена *At2g01070* (рис. 16), который кодирует РТМ1-подобный трансмембранный белок, содержащий семь трансмембранных доменов, который вместе с 7ТМ1 взаимодействует с компонентами G-связанного белкового рецептора и участвует в транспортировке белка синтазы целлюлозы к плазматической мембране. (табл. 2). В лизатах этот белок очищается совместно с поздними везикулами Гольджи, которые вносят вклад в формирование клеточной стенки и мембраны, а также доставляют регуляторные молекулы; следовательно, разрушение такого гена может влиять на свойства мембран и клеткообразование, процесс, заблокированный в мутантных зародышевых мешках *kup*.

В *ast* 5'-конец *Ds* прерывает шестой экзон гена *At3g03030*, кодирующего F-box/ суперсемейства RNI-подобного белка, а 3'-конец обнаружен в пятом экзоне гена *At3g03060*, кодирующего белок, аналогичный АТФазному семейству белков ААА-типа (Bayer et al., 2006), тем самым инсерция *Ds*, вероятно, способствовала делеции двух других генов, *At3g03040* и *At3g03050* (рис. 16). Поэтому оставалось неясным, какой из удаленных генов может отвечать за фенотип. Чтобы связать фенотип с одним из поврежденных генов мы исследовали несколько дополнительных мутантов из других коллекций с инсерциями в этих генах. Инсерции Т-ДНК в экзоны *At3g03030* (SALK_094197) и *At3g03040* (SALK_056065 и SALK_056153) не показали очевидных фенотипов. Однако, инсерция *Ds* в экзон *At3g03050* вызывала небольшое снижение количества зрелых семян в стручках, которые содержали примерно 10% неоплодотворенных семязачатков (табл. 3). *At3g03050* кодирует белок, подобный синтазе целлюлозы, мутации в котором вызывают разрыв кончиков корневых волосков вскоре после их образования. (Bernal et al., 2008). Этот ген необходим для синтеза нецеллюлозного полисахарида клеточной стенки, он экспрессируется в зародышевом мешке, как было показано сравнительным генетическим профилированием (Johnston et al., 2007). Однако две другие инсерции в экзонны в *At3g03050* не обнаружили связанного с фертильностью фенотипа, что указывает на малую вероятность того, что этот ген отвечает за фенотип *ast*. Нарушение промоторной области *At3g03060*

(SALK_1304_B10) ассоциировалось с наличием 8% неоплодотворенных семязачатков и 15% абортированных семян в зрелых стручках (табл. 3). Этот ген кодирует белок семейства АТФаз AAA-типа (Bayer et al., 2006). Однако, поскольку вторая инсерция Т-ДНК в экзон не демонстрировала явного фенотипа, At3g03060, вероятно, не является причиной летальности гаметофитов у мутантов *ast*.

Таблица 3. Оценка фертильности инсерционных линий.

Мутант/прерванный ген	инсерционная линия	место инсерции	п растений	п семян	фенотип фертильности
<i>astlik</i> /At3g03050	GT_5_48498	экзон	19	4650	90%N + 9.9%UO + 0.1%A
<i>astlik</i> /At3g03060	SALK_1304_B10	промотор	3	691	77%N + 8%UO + 15%A
<i>yarilo</i> /At2g34680	SALK_113675	интрон	15	1652	76%N + 22.7%UO + 1.3%A
<i>didilia</i> /At2g01110	UNE3	экзон 1	22	1760	68.2%N + 6%UO + 25.8%A
	GT_5_74422	экзон 1	15	5647	67.7%N + 8%UO + 24.3%A
	GT_5_105311	экзон 1	15	3376	67.8%N + 6.2%UO + 26%A

N - нормальные семена; A - абортированные семена; UO - неразвитые семязачатки

Помимо небольшой делеции на хромосоме 3 в *ast*, 3'-конец *Ds* был обнаружен на хромосоме 1 в шестом экзоне At1g75990, гена, который кодирует регуляторную субъединицу 26S протеасомы RPN3b, участвующую в убиквитин-зависимых катаболических процессах белков (Vierstra, 2003 ; Smalle and Vierstra, 2004; Yang et al., 2004), необходимых для развития гаметофита (Gallois et al., 2009) и нормального протекания митоза у всех эукариот (Den Elzen and Pines, 2001; Vierstra 2003; Smalle and Vierstra, 2004; Yang et al., 2004, Brukhin et al., 2005b). Принимая во внимание то, что нам не удалась амплификация 5'-конца *Ds*, и то, что был обнаружен только один элемент *Ds* в геноме растений этой линии (рис. 15A), а также, что коэффициент сегрегации Kan^r согласуется с единственной вставкой (таблица 2), мы пришли к выводу, что на хромосоме 1 присутствует только короткий участок 3'-конца *Ds*. Напротив, инсерция *Ds* на хромосоме 3, по-видимому, связана с делецией, как было отмечено и для других линий, которые

были получены с использованием системы транспозонов (Oh et al., 2003; Page et al., 2004, Voavida et al., 2009).

Учитывая сложные перестройки, наблюдаемые в *ast*, пока невозможно отнести дефект к конкретному гену. Однако, поскольку мутант демонстрирует остановку митоза ядер в зародышевом мешке, вполне может быть, что мутация в *RPN3b* играет главную роль в фенотипе *ast*. Хотя отдельные вставки в генах At3g03030 и At3g03040, оба из которых кодируют белки F-box, не имеют очевидных фенотипов, их одновременное нарушение может вносить вклад в фенотип митотического класса, наблюдаемый у *ast* мутантов. Белки F-box являются компонентами комплексов SCF убиквитиновых лигаз, которые функционируют в качестве связывающих субстратов для опосредованного убиквитином протеолиза (Kipreos, Paqano, 2000; Dumbliauskas et al., 2011; Brukhin et al., 2011). Опосредованное убиквитином удаление регуляторных белков, контролирующих клеточный цикл, крайне важно для нормальной митотической прогрессии, а нарушение функции этих ферментов может приводить к остановке митоза, возможно, в сочетании с нарушением *RPN3b* у *ast* мутанта (Brukhin et al., 2005b; 2011).

У *amn Ds* элемент был встроен в 12-й экзон гена At4g02700, кодирующего переносчик сульфата 3;2 (рис. 16), который, согласно литературным данным, отвечает за поглощение и транслокацию сульфата через клеточную мембрану (Takahashi et al., 2000), его экспрессия повышена в зародышевом мешке (Johnston et al., 2007). Однако оценка восьми дополнительных инсерций T-ДНК в кодирующей области At4g02700 не выявила фенотипа фертильности, что указывает на то, что этот ген не отвечает за фенотип *amn* (Brukhin et al., 2011).

У мутанта *aps Ds* элемент был обнаружен в первом экзоне гена At5g44520, кодирующем белок, родственной рибулозо-5-фосфатизомеразе (рис. 16). Этот ген экспрессируется в зрелой пыльце, в молодых листьях и в глобулярном и зрелом зародыше. Также экспрессия гена наблюдалась в плодолистиках, цветах, меристемах соцветия (Cui et al., 2015; Caggiano et al., 2021).

У *yar* 5'-конец *Ds* элемента был обнаружен в восьмом экзоне гена *AIR9* (AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES9) (At2g34680), который ранее был идентифицирован при дифференциальном скрининге библиотеки кДНК, при сравнении обработанных и не обработанных ауксином корневых культур (Neuteboom et al., 1999; Klepikova et al. 2016). Белок AIR9 ассоциируется с микротрубочками у наземных растений, где он распознает сайты кортикальных делений во время препрофазы, а позже сайты образования клеточной пластинки во время цитокинеза (Buschmann et al., 2006; Mir et al., 2018). Метапрофильный анализ экспрессии генов с использованием инструментов Genevestigator (Hruz et al., 2008) показывает, что At2g34680 в высокой степени экспрессируется в меристемах соцветий, цветках, тычинках, плодolistиках, корнях зрелого растения, а также в молодой розетке и на стадии цветения развивающихся растений. Репортерный ген β -глюкуронидазы (*GUS*), присутствующий на транспозоне *Ds* в *yar*, обнаруживал сильную экспрессию в корнях молодых проростков примерно через две недели после прорастания (рис. 14I), в то время как другие вегетативные или генеративные части мутантных растений не проявляли активности *GUS*.

Оценка линий с соответствующими инсерциями из других коллекций выявила сложную ситуацию: 3 линии (две с инсерциями экзоне и одна в промоторной области) не проявляли явного фенотипа, но одна линия демонстрировала пониженную фертильность, аналогичную *yar*: инсерция Т-ДНК (линия SALK_113675) в интроне At2g34680 демонстрировала стручки с 22,7% неоплодотворенных семязачатков и 1,3% абортированных семян у гетерозиготных растений (табл. 3). При скрининге мутантов, влияющих на мужскую прогамную стадию развития, тот же самый ген был нарушен в мутанте *ungud9* (*ung9*), вызывая снижение эффективности передачи по мужской и женской линиям на 4,2% и 55,3% соответственно (Lalanne et al., 2004). Учитывая, что гаметофитные мутантные фенотипы часто проявляют переменную экспрессию и что и *yar* и *ung9* продуцируют абортированные семена, *yar* вполне может быть аллелью *ung9*. Однако 3'-конец *Ds* в *yar* не удалось обнаружить ни с помощью TAIL-PCR, ни с помощью iPCR, возможно, потому что он подвергся делеции в процессе

транспозиции. В настоящее время мы не знаем, нарушает ли инсерция только один ген или также граничит с соседней делецией. Учитывая, что *AIR9* находится вблизи *Ds* (*DsG1*; Sundaresan et al., 1995) и что несколько делеций образовывались путем внутривромосомного вырезания гибридного *Ds*-элемента из этого региона (Page et al., 2004), возможно, что *ung9* и *yar* также являются делеционными мутантами. Из-за сложных картины с инсерцией *Ds*, а также, как и с инсерцией T-ДНК в *AIR9*, пока невозможно окончательно отнести фенотип *yar* к данному гену, индуцируемому ауксином.

У *did* *Ds*-элемент прерывает первый интрон гена At2g01110 (рис. 16). Этот ген кодирует белок Twin-Arginine Translocation C (ТАТС), ответственный за организацию и биогенез тилакоидной мембраны (Motohashi et al., 2001; Allen et al., 2002; Ouyang et al., 2020; Taw et al., 2022). ТАТС является основным компонентом активности ΔpH-зависимого белкового транспортера (Yen et al., 2002). Ген репортер *GUS* *Ds*-элемента обнаруживал сильную экспрессию как в проростках (рис. 14H), так и в зрелых растениях, включая все части цветка (не показано). Яйцеклетки также экспрессировали *GUS* (рис. 14G), после оплодотворения наблюдалась активность *GUS* в эндосперме, но не в зародыше. Мета анализ экспрессии на микрочипах с помощью инструмента Genevestigator (Hruz et al., 2008) показал, что ген At2g01110 экспрессируется во многих вегетативных и генеративных органах, особенно высокая активность экспрессии гена наблюдалась в семенах, зародышах, цветках, цветоножках и листовых примордиях. Во время развития растений пик экспрессии приходится на стадию цветения. Мутанты, влияющие на ген At2g01110, также были обнаружены при скрининге летальности проростков (Budziszewski et al., 2001), а соответствующий белок был выявлен в протеомах митохондрий (van der Merwe and Dubery, 2007) и хлоропластов (Zybailov et al., 2008). Другие мутанты с нарушением гена At2g01110, были ранее идентифицированы как *albino* и *pale green2* (*apg2*) (Motohashi et al., 2001) и *unfertilized embryo sac3* (*une3*) (Pagnussat et al., 2005). Последнее показывает, что ген играет важную роль в формировании зиготы и эндосперма после двойного оплодотворения (Pagnussat et al., 2005). Анализ двух дополнительных

инсерционных линий (GT_5_74422 и GT_5_105311), несущих *Ds* элемент в экзоне At2g01110, а также анализ мутанта *une3* выявили фенотипы с нарушением фертильности, сходные с таковыми у *did*. Таким образом, *did*, вероятно, является аллелью *arg2* и *une3*, а материнский фенотип *did* может быть отнесен к нарушению гена At2g01110, что, как ожидается, вызывает появление дефектных пластид и/или митохондрий, которые наследуются по материнской линии.

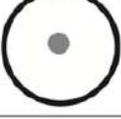
2.3.6 Анализ фенотипа пыльцы (мужских гаметофитов) у исследуемых мутантов

Анализ зрелой пыльцы, окрашенной DAPI, у мутанта *kup* показал, что около 12% пыльцевых зерен были аномальными по сравнению с 5% у дикого типа (таблица 4). Дефектные зрелые пыльцевые зерна содержали только два ядра, что согласуется с дефектом митотической прогрессии. Аномальная пыльца содержала либо одно слабоокрашенное вегетативное ядро и одно сильно окрашенное ядро спермия, либо два слабоокрашенных удлинённых ядра.

Оценка пыльцевых зерен у мутанта *ast/AST* показала, что 10% зрелых пыльцевых зерен имеют аномальные фенотипы, сходные с таковыми у *kup* (табл. 3). Около 10% зрелых пыльцевых зерен у гетерозиготного мутанта *amn/AMN* обнаруживали следующий дефект: 3% содержали только одно ядро (рис. 17 С), а остальные 7% пыльцевых зерен имели два ядра, подобно тому, что наблюдалось у *kup* и *ast* (таблица 4). У мутантов *aps/APS* 9% процентов зрелых пыльцевых зерен были аномальными, при этом большинство из них содержали только одно большое, слабоокрашенное и одно маленькое, сильно окрашенное ядро (таблица 4; рис. 17 D). Исследования поведения пыльцы *in planta* у *uar* показали, что большое количество пыльцевых зерен у *uar* не прилипали к зрелому рыльцу пестика. Наблюдение за пыльцой, окрашенной DAPI, показало, что почти 33% пыльцевых зерен были дефектными (таблица 4), только одно сильно окрашенное ядро наблюдалось почти у 5% пыльцы, два слабо окрашенных удлинённых (возможно, деградирующих) ядра были обнаружены у 24% пыльцевых зерен (рис. 17 E).

Мутантные растения *DID/did* продуцировали около 8% аномальных пыльцевых зерен, содержащих только два ядра (таблица 4), одно и которых напоминало спермий и одно вегетативное ядро, либо два слабо окрашивающихся удлиненных ядра. Изредка присутствовали два напоминающие спермии сильно окрашенные ядра (рис. 17 F).

Таблица 4 - Фенотипы зрелых пыльцевых зерен гаметофитных мутантов.

DAPI fluorescence pattern	<i>kup</i> n=553	<i>ast</i> n=525	<i>amn</i> n=766	<i>aps</i> n=513	<i>yar</i> n=661	<i>did</i> n=422	wt n=566
	88.6%	90.3%	90.1%	91.4%	67.2%	92.2%	95.2%
			0.3%		3.3%	0.5%	0.5%
	3.4%	3.2%	2.2%	7.6%		4%	1.5%
	7.6%	6.5%	4.6%	1%	24.2%	2.6%	2.8%
	0.4%		0.1%		0.8%	0.7%	
			2.7%		4.5%		

wt – дикий тип; n – количество исследованных пыльцевых зерен. Примеры паттернов флуоресценции DAPI представлены на рис. 17.

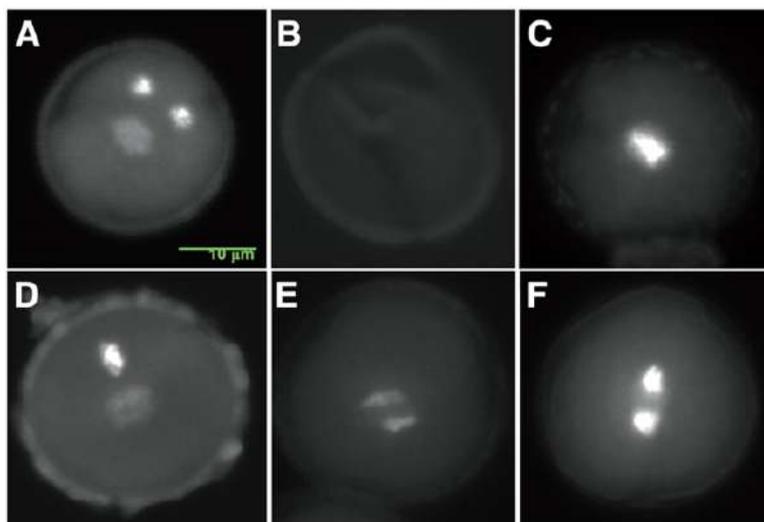


Рисунок 17 - Паттерны флуоресценции DAPI в пыльцевых зернах исследованных растений. (A) Дикий тип. (B-F) Дефектные пыльцевые зерна различных мутантов. (A) Пыльцевое зерно, содержащее слабо окрашенную крупную вегетативную клетку и два сильно окрашенных маленьких ядра спермиев. (B,C) Пыльцевые зерна *atn*. (B) Пыльцевое зерно без ядра. (C) В этом пыльцевом зерне *atn* присутствует только одно сильно окрашенное ядро. (D) Пыльцевое зерно *aps*, содержащее только один спермий и одно ядро вегетативной клетки. (E) В этом пыльцевом зерне *uar* видны два слабо окрашенных удлинённых, возможно деградирующих ядра. (F) В этом пыльцевом зерне обнаружены только два сильно окрашенных ядра спермиев (Brukhin et al., 2011).

2.3.7 Гаметофитные мутации демонстрируют плейотропные эффекты при остановке развития гаметофита

Несмотря на небольшие размеры и ограниченное количество клеток, из которых состоит женский гаметофит, в его развитии и функционировании принимают участие многие клеточные процессы (Grossniklaus, Schneitz, 1998; Yadegari, Drews, 2004; Dresselhaus, 2006). Всего у арабидопсиса нами обнаружено шесть классов дефекта женского гаметофита (Brukhin et al., 2005a), однако наиболее часто встречались четыре класса мутантов: митотический, кариогамный,

дегенеративный и материнского эффекта, приводящего к остановке развития семян. Однако, несмотря на преобладающую стадию остановки, экспрессия фенотипа у всех мутантов обнаруживала вариабельность (рис. 15B). В предыдущих исследованиях мутантов женского гаметофита хорошо задокументировано, что развитие редко останавливается на одной конкретной стадии (Bonhomme et al., 1998; Howden et al., 1998; Grini et al., 1999; Moore et al., 1997; Pagnussat et al., 2005; Brukhin et al., 2011), и что в зародышевом мешке экспрессируется большое количество генов (Yu et al., 2005; Johnston et al., 2007; Jones-Rhoades et al., 2007; Steffen et al., 2007; Wuest et al., 2010; Schmidt et al., 2012). Фенотипическая изменчивость может быть вызвана разной степенью переноса мРНК, которая сохранилась от более ранней экспрессии генов в материнской клетке мегаспоры, и/или генетической избыточностью (редундантностью от англ. *redundancy*) в геноме арабидопсиса.

В дополнение к вышесказанному, многие гаметофитные мутанты вызывают материнские эффекты, которые приводят к абортивности семян. В исследованиях Pagnussat et al. (2005) сообщается, что из 130 исследованных женских гаметофитных мутантов около половины оказались дефектными на стадиях после оплодотворения из-за наличия мутантного материнского аллеля. Аналогичная частота была обнаружена Moore (2002), в исследовании 7 из 14 женских гаметофитных мутантов были обнаружены явные материнские эффекты. В нашем исследовании три мутанта показали низкий уровень абортивности семян (*yar*: 3 %; *amn*: 5 %; *aps*: 8 %), в то время как мутант *did*, который был идентифицирован как мутант с материнским эффектом, обнаружил высокий уровень абортивности семян равный 25%. Поздние материнские эффекты, оказывающие влияние на зрелые семена, могут объяснить несоответствие между низкой эффективностью передачи и мягким полустерильным фенотипом, подобно тому, что наблюдалось у *yar* и *aps*. У этих мутантов семена, имеющие нормальный внешний вид, не прорастали либо погибали вскоре после прорастания.

Оценка дефектов зрелых пыльцевых зерен показала, что только *kup* и *yar* имеют значительную долю дефектной пыльцы (*kup*: 12%, *yar*: 23%), в то время как

остальные мутанты продуцируют лишь небольшое количество аномальных пыльцевых зерен ($\leq 10\%$). За исключением *ast*, у которого наблюдалась трансмиссия дикого типа через мужской гаметофит, довольно редко фенотип в зрелых пыльцевых зерен не коррелирует со значительным снижением эффективности мужской трансмиссии. Следовательно, дефекты должны иметь место не только во время развития пыльцы, но и в прогамной фазе (Lalanne et al., 2004), т. е. во время роста пыльцевых трубок или при их распознавании зародышевым мешком.

2.3.8 Гаметофитные мутации часто связаны с хромосомными перестройками

Как очевидно из нашего исследования, многие сайты инсерций оказались сложными, включая хромосомные перестройки, особенность, которая часто наблюдалась при вставках Т-ДНК, но до сих пор редко ассоциировалась с транспозицией *Ds* транспозона. Общая встречаемость делеций, связанных с *Ds*, оценивается примерно в 1% (Page et al., 2004), однако наше исследование женских гаметофитных мутантов (Brukhin et al., 2011), а также опубликованное ранее исследование мутаций, ассоциированных с мужским гаметофитом, в котором по крайней мере 16 из 39 инсерций *Ds* были связаны с перестройками (Voavida et al., 2009), указывают на гораздо более высокую частоту хромосомных aberrаций, возникающих в результате транспозиций *Ds*. Поскольку большие делеции и транслокации обычно ведут к уменьшению гаметофитной трансмиссии, скрининг гаметофитных мутантов может обнаружить значительное обогащение хромосомными перестройками (Oh et al., 2004; Page et al., 2004; Voavida et al., 2009). Более того, у двух проанализированных нами мутантов с «чистыми» инсерциями *Ds* (*amn* и *aps*, см. рис. 16) фенотип оказался не связанным с местом вставки *Ds*, что было обнаружено при анализе нескольких дополнительных аллелей. Хотя известно, что *Ds*-элементы могут снова транспонироваться после инсерции, оставляя след в месте предыдущей инсерции, который может вызвать мутантный фенотип, для описываемой системы было зарегистрировано лишь несколько таких случаев (Grossniklaus et al., 1998; Escobar-Restrepo et al., 2007). Следовательно,

гаметофитные мутанты, обнаруженные с помощью *Ds* или T-ДНК инсерционного мутагенеза, необходимо тщательно проверять, а также следует соблюдать осторожность при интерпретации функций генов на основе идентификации последовательностей, фланкирующих сайты вставки (Pagnussat et al., 2005; Boavida et al., 2009; Brukhin et al., 2011).

В результате вышеупомянутых проблем только один из шести описанных выше мутантов мог быть однозначно быть ассоциирован с нарушенным геном – мутант с материнским эффектом, который оказался аллельным гену *apg2* и *ine3*, кодирующим ТАСТ- подобный белок (Motohashi et al., 2001; Pagnussat et al., 2005; Brukhin et al., 2011). Для двух других мутантов, *ast* и *yar*, гены, нарушенные инсерцией *Ds*-элемента, и связанные с ними перестройки, вероятно, также принимают участие в развитии гаметофита, поскольку некоторые из проанализированных дополнительных аллелей с нарушением этих генов демонстрируют частичные аспекты наблюдаемого фенотипа. Наконец, *atn* и *aps* явно не помечены *Ds*-элементом, несмотря на тесную косегрегацию фенотипа с наличием единственного в геноме *Ds*. Для *kup* вопрос об идентичности гена, вызывающего фенотип, остается открытым, поскольку что две линии, доступные в других коллекциях, представляющие два мутантных аллеля, обнаружили несогласующиеся результаты.

Глава 3. Молекулярно-генетическая регуляция эмбриогенеза растений

Эмбриогенез — это самая начальная стадия развития нового организма из его первой клетки, называемой зиготой, которая возникает в результате полового оплодотворения, т. е. слияния яйцеклетки и сперматозоида. У цветковых растений развитие зародыша обычно происходит после процесса двойного оплодотворения, описанного в предыдущих главах. Вскоре после оплодотворения зигота вступает в период покоя, который может длиться от нескольких минут до нескольких месяцев у разных видов растений, после этого она претерпевает ряд последовательных делений, в результате чего образуется зрелый зародыш (Brukhin, 2006; Brukhin, Morozova, 2011).

У животных план тела и все ткани органов формируются в процессе эмбриогенеза. По сравнению с животными зародыши растений устроены довольно просто, и большая часть органов формируется постэмбрионально из меристем, благодаря сохранению многими клетками растений тотипотентности, то есть возможности клетки пойти по различным путям морфогенеза, благодаря позиционной и/или эпигенетической регуляции (Brukhin, Albertini, 2021). На ранних стадиях эмбриогенеза покрытосеменных зародыши имеют радиальную симметрию, которая позже сменяется билатеральной. Эмбриогенез покрытосеменных растений обычно делится на три фазы: первая включает в себя установление полярности и продолжается до стадии глобулярного зародыша. На этой стадии так называемый проэмбрио (от зиготы до глобулярного зародыша) имеет радиальную симметрию. На втором этапе морфогенетические процессы в зародыше формируют базисный клеточный паттерн, определяющий дальнейшее развитие, образуются ткани первичных слоев, а также закладываются зоны развития меристематической ткани. Третья фаза — постэмбриональная, включающая в себя процессы приготовления зародыша к десикации, покою и прорастанию. Зрелые зародыши растений имеют билатеральную симметрию и состоят из главной оси (семядоли, эпикотиль, апикальная меристема побега (SAM от англ. Shoot Apical Meristem), гипокотиль, апикальная меристема корня (RAM, от

англ. Root Apical Meristem). Однодольные растения имеют только одну семядолю, а двудольные — две.

Критическое число клеток, после которого проэмбрио вступает в первую стадию дифференцировки, т. е. образование эмбриодермы, различается в разных семействах растений, например у *Paeonia anomala* и *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae) 400-500 клеток (Брюхин, 1993; Brukhin, Batygina, 1994; Батыгина, Брюхин, 1997), у *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) насчитывается около 500 клеток (Батыгина, Васильева, 2002), тогда как у *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) всего 16 клеток (Howell, 2000).

Вопрос о генетическом контроле трансформации симметрии до сих пор остается дискуссионным. Имеются данные, подтверждающие роль полярного транспорта ауксинов в этом процессе, показывающие, что применение ингибиторов транспорта ауксинов вызывает образование аберрантных зародышей (Geldner et al., 2001; 2003; 2004).

Для примера рассмотрим наиболее распространенный эмбриогенез типа *Capsella*, типичный для двудольного модельного растения *Arabidopsis thaliana* из семейства Brassicaceae (рис. 18) (Brukhin, Morozova, 2011).

Установление полярности — один из фундаментальных шагов в организации плана тела нового спорофита. Полярность начинается с процесса оплодотворения, когда после слияния яйцеклетки и сперматозоида ядро зиготы мигрирует из центральной части к халазальному полюсу клетки. После первого асимметричного деления зиготы образуются маленькая апикальная клетка, которая позже становится зародышем, и большая базальная клетка, предшественник суспензора (рис. 18А, a-b). Первое и несколько последующих делений апикальной клетки образуют проэмбрио, в то время как базальная клетка, прикрепленная к материнской ткани, совершает продольные деления, образуя суспензор, структуру, которая поставляет питательные вещества из эндосперма растущему зародышу и прикрепляет его к материнской ткани. Суспензор состоит из крупных вакуолизированных клеток, содержащих мелкие ядра. У арабидопсиса зрелый суспензор содержит восемь клеток, а самая верхняя клетка суспензора называется

гипофизисом. Последний принимает участие в формировании латерального корневого чехлика и апикальной меристемы корня, а также считается, что он участвует в синтезе ауксина и, следовательно, в поддержании полярности вдоль главной оси формирующегося зародыша (Brukhin, Morozova, 2011). Интересно, что суспензор не имеет плазмодесм (микроскопических каналов, пронизывающих клеточную стенку, обеспечивающих связь между соседними клетками и молекулярный транспорт) и связи с клетками собственно зародыша, однако он образует развитые выросты клеточной стенки, характерные для гаусторий-подобных клеток-переносчиков (Wardlaw, 1955; Kozieradzka-Kiszkurno et al., 2020).

Первое деление апикальной клетки поперечное (рис. 18А b). Затем поперечные деления чередуются с продольными и, таким образом, проэмбрио проходит стадии двух- (рис. 18А с), четырех- (квадрант), восьми- (октант), 16-клеточных проэмбрио (рис. 18А d) и так далее до глобулярной стадии (рис. 18А e), когда наступает начало гистогенеза, т. е. дифференцировки тканей у зародыша. На глобулярной стадии в зародыше происходят радиальные деления, образующие внешний слой клеток, дифференцирующихся в протодерму (Pd). Два внутренних слоя клеток глобулярного зародыша имеют разные судьбы развития: клетки основной меристемы (Gm) накапливают белки и масла, они дают начало кортикальной паренхиме и прокаμβиальным клеткам (Pc), которые являются предшественниками проваскулярных клеток. Клетки в разных слоях отличаются характером деления и морфологией. На поздней глобулярной стадии субэпидермальные клетки инициируют антиклинальные деления, образуя зачатки семядолей (первые зародышевые листья), таким образом, зародыш вступает в раннюю сердцевидную (или переходную) стадию (рис. 18А-f, 18 С). В дальнейшем семядоли продолжают увеличиваться в размере, между ними дифференцируется апикальная меристема побега. Нижний слой зародыша образует гипокотиль и корневую меристему. Начиная с сердцевидной стадии зародыш приобретает двустороннюю симметрию. Последующее формирование органов (органогенез) придает зародышу форму и соответствующее название стадий:

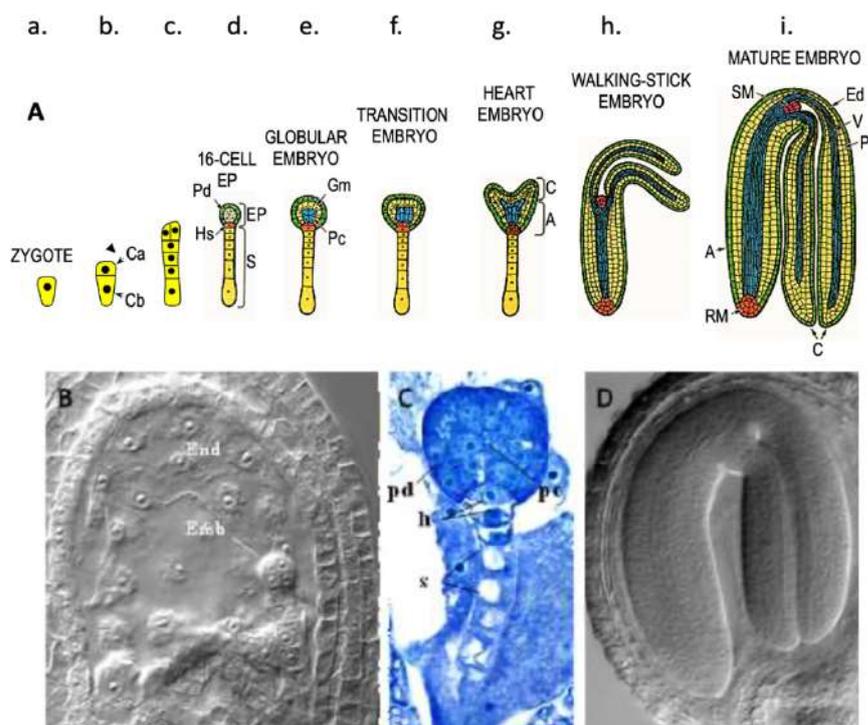


Рисунок 18 - Эмбриогенез у арабидопсиса. А – Схематическое изображение основных стадий эмбриогенеза. а – зигота, b – двухклеточный зародыш, c – проэмбрио на стадии квадранта, d – ранний глобулярный 16-клеточный зародыш, e – глобулярный зародыш, f – зародыш на переходной стадии, g – сердечковидный зародыш, h – зародыш с изогнутыми семядолями (стадия «трости»), i – зрелый изогнутый зародыш. А – ось, С – семядоли, Ca – апикальная клетка, Cb – базальная клетка, Ed – эпидермис, EP – собственно зародыш, Gm – основная меристема, Hs – гипофизис, P – прокамбиальная ткань, Pc – прокамбий, Pd – протодерма, PE – собственно зародыш, RM – меристема корня, S – суспензор, Sm – меристема побега, V – сосудистая ткань. В, D – просветленные семена под световым микроскопом с DIC (дифференциально-интерференционным контрастом), В – зародыш на стадии квадранта. С – гистологический срез зародыша на стадии раннего сердечка, заключенного в Technovit, окрашенный толуидиновым синим под световым микроскопом. D – зрелый зародыш со сформировавшимися изогнутыми семядолями. Emb – зародыш, End – эндосперм h – производные гипофизарной клетки; pc – прокамбиальные клетки; pd – протодерма; c – суспензор (Brukhin, Morozova, 2011).

сердечковидный, торпедовидный и стадия «трости» (изогнутые семядоли) (рис. 18A h-i; 18 D). Дифференцировка проваскулярных и прокаμβиальных тканей начинается с сердечковидной стадии.

Зародыши растений относительно просты по морфологии, однако на разных стадиях эмбриогенеза экспрессируется большое количество генов. Например, у арабидопсиса для нормального эмбриогенеза необходимы по крайней мере 4000 генов. Согласно концепции формирования паттернов в зародышах животных и растений выделяются отчетливые сегменты или модули, каждый из которых имеет свою полярность и определенным образом взаимодействует с другими сегментами (Brukhin, Morozova, 2011).

Лишь немногие гены являются мастер регуляторами (главными генами), т. е. участвуют в формировании паттерна и контролируют основные процессы плана развития тела эмбриона. Согласно Юргенсу (Jürgens, 1991), лишь около 1% всех генов, необходимых для эмбриогенеза растений, являются мастер регуляторами. Одним из первых генов арабидопсиса, который селективно экспрессируется после первого деления зиготы только в апикальной клетке, является ген *ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER1 (ATML1)* (Lu et al. 1996). Кроме того, на формирование паттернов эмбриогенеза у арабидопсиса влияют несколько других ключевых генов.

Мутация в гене *GNOM* ведет к нарушению установления апикально-базальной полярности у зародыша (Mayer et al., 1993). Первое деление зиготы у мутантов *gnom* не является асимметричным, поэтому образующиеся апикальная и базальная клетки почти одинакового размера. Зародыши мутантов *gnom* выглядят почти круглыми, что приводит к их гибели.

Мутация в гене *MONOPTEROS* вызывает делецию базальной области, отсутствие гипокотилия и корневой апикальной меристемы. У мутантов *monopteros* развиваются только клетки верхнего яруса проэмбрио, а клетки нижнего яруса остаются изодиаметрическими и не образуют линейных рядов (Berleth, Jürgens, 1993). Семядоли у *monopteros* демонстрируют меньшую позиционную симметрию,

чем у зародышей дикого типа, что указывает на то, что базальная область проэмбрио, по-видимому, участвует в установлении гормональных градиентов. Показано, что хотя мутанты *tomopteros* не способны к организации базального яруса, они не теряют способность образовывать корни при специальном воздействии на них (Berleth, Jürgens, 1993). Таким образом, *MONOPTEROS* влияет на фенотип ранних стадий развития зародыша, хотя и позже, чем *gnom* (Brukhin, Morozova, 2011).

Важнейшую роль в организации плана тела зародыша играют градиенты гормона ауксина. Большую роль в перенос ауксина при эмбриогенезе играют белки семейства PIN (Friml et al., 2003). Сразу после деления зиготы ауксин накапливается в меньшей, апикальной клетке Са. Происходит активация ауксинового ответа, и клетка Са становится родоначальницей проэмбрио. Химическое ингибирование оттока, а также мутации генов *PIN* вызывают нарушение установления апикально-базального градиента ауксина. Таким образом, активно поддерживаемый PIN-зависимый градиент ауксина необходим для спецификации апикальной клетки, которая в дальнейшем становится родоначальницей проэмбрио и всех апикальных структур растения (Brukhin, Morozova, 2011).

Ген *GURKE* контролирует формирование центрального и апикального доменов развивающегося зародыша. Дефекты у мутантов *gurke* обнаруживают отчетливый фенотип на ранней сердечковидной стадии во время перехода зародыша от радиальной к билатеральной симметрии. Дефектные аллели *GURKE* являются причиной нарушения образования семядолей из-за неправильной ориентации и задержки делений в клетках, которым суждено стать зачатками семядолей (Torres-Ruiz et al., 1996).

Другой тип генов, влияющих на паттерны зародыша — это гены, участвующие в установлении радиальной оси. Нарушение гена *KNOLLE* вызывает аномалии радиальной симметрии. Мутанты *konlle* обнаруживают очевидные дефекты на ранней глобулярной стадии, сопровождающиеся отсутствием отчетливого эпидермиса, который нарушается и дезориентируется. Клонирование

и идентификация функции *KNOLLE* позволило выявить белок, который кодирует этот ген. По-видимому, обнаруженный белок участвует в формировании мишеней плазматической мембраны для секреторных везикул (Lukowitz et al., 1996).

Последовательность клеточных делений в зародышах происходит в соответствии с их предполагаемой функцией в определенных пространственных и временных паттернах. Развитие зародыша сначала управляется определенными мастер регуляторными генами, за которыми следует эпистатическое действие множества менее значительных генов (Brukhin, Morozova, 2011).

Poethig et al. (1986) создали карту порядка деления и судьбы эмбриональных клеток кукурузы (однодольное растение), а Scheres et al. (1994) создали аналогичную карту для арабидопсиса (двудольное растений) с использованием трансгенных маркеров. Шерес с коллегами (Scheres et al., 1994) проследили судьбу клеток сердечковидного зародыша, сосредоточив внимание на порядке деления клеток корня и гипокотилия. Важным наблюдением было то, что границы секторов не такие определенные, как морфологические границы. Это указывает на то, что клеточные линии коррелируют с планом тела только в общем, но не абсолютно.

Отличительной чертой растений от животных, является то, что растения могут также размножаться бесполом или вегетативным путем, т.е. способны к размножению из соматических тканей спорофита, без предварительного слияния гамет. Это связано с высоким уровнем тотипотентности и плюрипотентности многих растительных клеток, влияющей на способность к соматическому эмбриогенезу, апомиксису и вегетативному размножению.

Важным событием на всех этапах развития зародышевого мешка и эмбриогенеза является деградация регуляторных молекул в нужное время и в соответствующих клетках зародыша. Основным игроком процесса устранения регуляторных белков является убиквитин-26S-протеасомный метаболический путь. В главе 4 будут рассмотрены полученные нами генетические мутации арабидопсиса, нарушающие разные этапы данного метаболического пути и влияние этих нарушений на гаметофитную стадию развития и эмбриогенез.

Глава 4. Влияние и регуляторная функция убиквитиного метаболизма на развитие женского гаметофита и эмбриогенез растений

4.1 Убиквитин-протеасомный метаболический путь и его связь с эмбриогенезом

Несколько мутантов с эмбрио-летальным фенотипом, изолированных нами в большом скрининге, обнаружили инсерции *Ds* элементов внутри генов, отвечающих за структуру субъединицы протеасомы 26S, тем самым привлекли наше внимание к дальнейшему исследованию этих мутантов, как и к изучению самого пути деградации белков, опосредованного убиквитином (Brukhin et al., 2005b; Thomann et al., 2005, Brukhin et al., 2011; Dumblauskas et al., 2011).

Протеасома 26S представляет собой АТФ-зависимую самокомпартментализованную протеазу 2.4-MD, которая расщепляет меченные убиквитином белки (Voges et al., 1999; Vierstra, 2003; Bard et al., 2018). Убиквитин-26S-протеасомный путь играет центральную роль в деградации короткоживущих и регуляторных белков, важных для множества клеточных процессов, включая развитие и дифференцировку (Wilkinson et al., 1999; Ciechanover et al., 2000; Weissman, 2001; Vierstra, 2009) (рис. 19). Большинство белков убиквитин-26S-протеасомного метаболического пути являются филогенетически высоко консервативными белками у всех эукариот.

Протеасома 26S обнаружена в ядре и цитоплазме как растений, так и животных. Она состоит из двух мультисубъединичных комплексов: коровой протеазы 20S (CP, англ. Core Protease) и регуляторной частицы 19S RP (англ. Regulatory Particle) (рис. 20). Доступ к полости CP, где происходит протеолиз, ограничен каналом, контролирующим вход только развернутых белков (Glickman, 2000). Считается, что RP осуществляет идентификацию подходящих субстратов для расщепления, удаляет присоединенные фрагменты убиквитина, открывает ворота α -субъединицы и направляет вхождение развернутых белков в полость CP для деградации. RP состоит из 17 субъединиц, которые образуют две субчастицы,

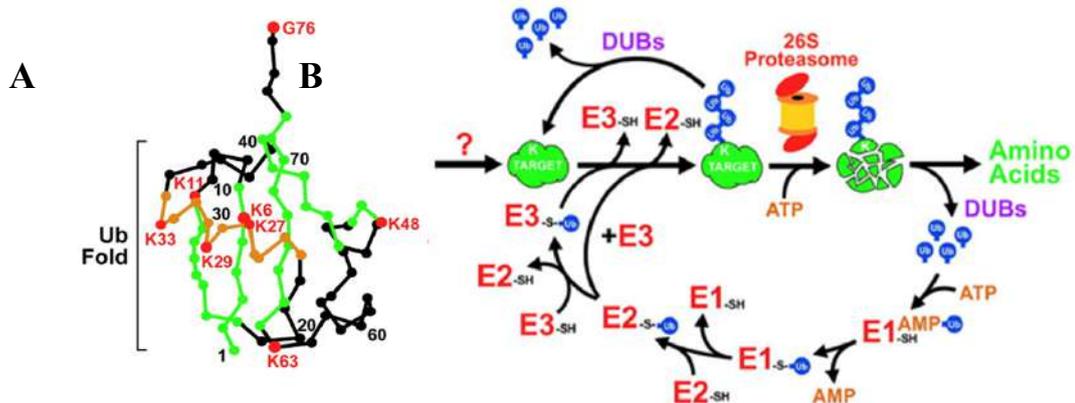


Рисунок 19 - Убиквитин-протеасомный путь. А. Убиквитин – небольшой консервативный белок, являющийся многократным сигналом распознавания. В. Система базируется на трех энзиматических группах: 1. убиквитин-активирующие (E1) ферменты; 2. убиквитин-конъюгирующие (E2) ферменты; 3. ферменты убиквитинпротеинлигазы (E3). DUBs – деубиквитирующие ферменты. Реакция убиквитинирования заключается в совместном действии всех трех ферментов: сначала, АТФ-зависимый E1-активирующий фермент образует тиоэфирную связь с С-концом Ub и переносит активированный Ub на E2-конъюгирующий фермент, а затем фермент убиквитинлигаза E3 переносит молекулу Ub на лизиновый остаток субстрата (Peters, 2006). Такой процесс метки повторяется несколько раз, образуя цепь убиквитина на субстрате, что приводит к их распознаванию протеасомой 26S, большим мультикаталитическим протеазным комплексом, который расщепляет убиквитинированные белки на короткие пептиды (Smalle, Vierstra, 2004).

«крышечку» и основание. Основание содержит три субъединицы, не являющиеся АТФазой (RPN1, RPN2 и RPN10), и шесть субъединиц АТФазы (от RPT1 до RPT6), которые контактируют с кольцом α -субъединицы и, вероятно, участвуют в разворачивании и транспортировке субстрата (Voges et al., 1999; Glickman, 2000; Fu et al., 2001). Крышечка связана с основанием и содержит остальные девять субъединиц (RPN3, RPN5 до RPN9 и RPN11 до RPN13).

В настоящее время известны функции лишь нескольких субъединиц RPN (Smalle, Vierstra, 2004). RPN10 способна связываться с полиубиквитиновыми цепями. Однако, поскольку она не существенна для дрожжей (van Nocker et al., 1996), эта субъединица, вероятно, не является основным компонентом распознавания убиквитина регуляторной частицей (RP). RPN11 и RPN13 (или UCH37) представляют собой протеазы, которые, как считается, высвобождают полиубиквитиновые цепи из субстратов (Verma et al., 2002; Vierstra, 2003). Было показано, что у человека субъединица RPN1 взаимодействует с убиквитин-протеинлигазой (E3) KIAA10 (You, Pickart, 2001). Было высказано предположение, что RPN1, так же, как и RPN2, образует рецепторы к убиквитин-подобным белкам Rad23 и Dsk2 в субкомплексе оснований (Saeki et al., 2002). Более того, домен богатых лейцином повторов (англ. leucine-rich-repeat-like) RPN1 может участвовать в распознавании белков, переносимых Rad23 к протеасомным АТФазам для дальнейшего развертывания (Elsasser et al., 2002). Деубиквитирующий фермент Ubr6 также распознает основание протеасомы через субъединицу RPN1. Деубиквитинирование с помощью Ubr6 предотвращает опосредованную RPN1 транслокацию убиквитина в 20S CP, у мутантов *ubr6* наблюдается высокая скорость оборота убиквитинирования (Legget et al., 2002).

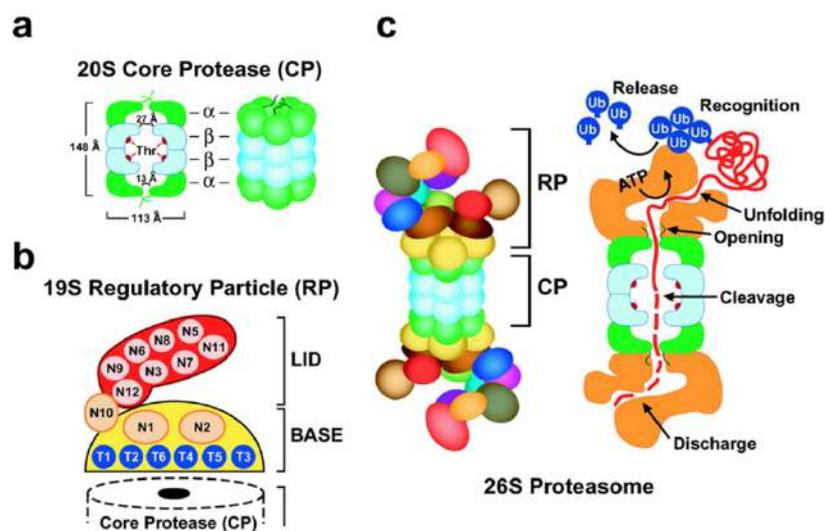


Рисунок 20 - Строение протеасомы 26S. Описание дано в тексте.

Протеасома 26S необходима для множества клеточных процессов, контролируемых селективной деградацией белков, меченных убиквитином (Voges et al., 1999; Vierstra, 2003). Таким образом, протеасому можно рассматривать как последнюю стадию жизненного цикла многих регуляторных белков. До недавнего времени считалось, что селективность убиквитин-26S-протеасомного пути зависит от реакции убиквитинирования. В этом механизме убиквитинлигазы E3 играют ключевую роль в выборе субстрата, поскольку они связываются как с убиквитин-конъюгирующими ферментами E2, так и реагируют на уникальные сигналы, присутствующие в белковых субстратах, для катализа и переноса убиквитина (Ciechanover et al., 2000; Pickart, 2004). Генетические исследования предполагают, что RP протеасомы 26S также способствует специфичности выбора субстрата (Vierstra, 2003; 2009; Mayor et al., 2005; Bard et al., 2018). Детальный механизм действия протеасомы 26S, как и многих E3 лигаз все еще плохо изучен.

4.1.1 Субъединица RPN1 протеасомы 26S играет важную роль в эмбриогенезе у арабидопсиса. Геном Arabidopsis thaliana содержит два гена RPN1

Чтобы идентифицировать ген *RPN1* арабидопсиса, был осуществлен поиск BLAST (Altschul et al., 1997) последовательности генома арабидопсиса (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), в качестве запроса использовали последовательность *Rpn1* дрожжей. Мы обнаружили два предсказанных белка с аминокислотной последовательностью, сходной с последовательностью RPN1 дрожжей на 36 и 32%. Мы называли их RPN1a и RPN1b, соответственно (рис. 21A), согласно номенклатуре, предложенной Yang et al. (2004) (Brukhin et al. 2005b). Ген *RPN1a* расположен на хромосоме 2 (At2g20580), а его паралог *RPN1b* — на хромосоме 4 (At4g28470). Два гена, по-видимому, локализованы в дублированных хромосомных сегментах (Blanc et al., 2000, 2003; Vision et al., 2000; Brukhin et al. 2005b) и демонстрируют 78% идентичности на уровне аминокислот по всей своей длине.

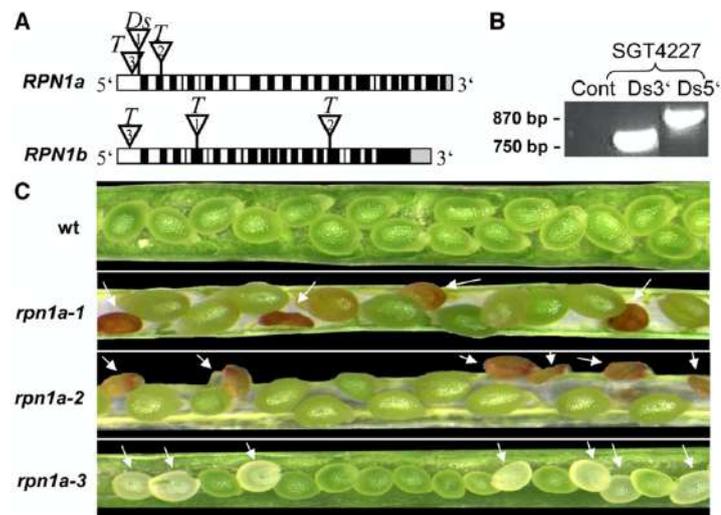


Рисунок 21 - Мутантные аллели гена *RPN1* и фенотипы *rpn1a*. (A) Схематическое изображение генов *RPN1a* и *RPN1b*. *RPN1a*: инсерция *Ds*- элемента (треугольник 1) линии SGT4227 (*rpn1a-1*) обнаружена в стартовом кодоне ATG первого экзона *RPN1a*; вставка Т-ДНК (треугольник 2) линии SALK_12604 (*rpn1a-2*) приходится на второй экзон *RPN1a*; инсерция Т-ДНК линии SALK_30503 (*rpn1a-3*) располагается на 300 п.н. выше кодирующей области в 5'-конце гена *RPN1a*. *RPN1b*: вставка Т-ДНК линии SALK_115981 (*rpn1b-1*) нарушает 5-й экзон и линии SALK_061211 (*rpn1b-2*) 17-й экзон *RPN1b* соответственно; в SALK_023490 (*rpn1b-3*) Т-ДНК встроена в промоторную область. Черные прямоугольники обозначают экзоны, белые прямоугольники – интроны, а серые прямоугольники – нетранслируемую область. (B) ПЦР-анализ 5' и 3' последовательностей, фланкирующих встроенный *Ds* в *rpn1a-1*. (C) мутанты *rpn1a* являются эмбриолетальными. Стручки у дикого типа демонстрируют полную завязываемость семян, в то время как у гетерозиготных растений *rpn1a-1*, *rpn1a-2* и *rpn1a-3* четверть семян абортируются (стрелки). (Brukhin et al. 2005b).

Судя по информации из базы данных UniGene Национального центра биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nih.gov/UniGene>), оба гена

RPNI экспрессируются в широком диапазоне тканей, причем мРНК *RPNIa* экспрессируется несколько обильнее, чем мРНК *RPNIb* (Brukhin et al. 2005b).

4.1.2 Характеристика мутантов с инсерциями транспозонов в генах *RPNIa* и *RPNIb*

Для выяснения функции генов *RPNI* арабидопсиса, мы идентифицировали полученные нами инсерционные мутанты и мутанты, доступные в публичных инсерционных библиотеках (Parinov et al., 1999; Alonso et al., 2003). Мы охарактеризовали GT линию SGT4227 с нарушением гена *RPNIa*. Как было сказано ранее, в главе 2, *Ds* элемент содержит ген неомицинофосфотрансферазы (*NPTII*), придающий клеткам устойчивость к канамицину, как доминантному маркеру. ПЦР-анализ с праймерами, сконструированными близко к обоим концам *Ds* элемента и в пределах фланкирующих последовательностей аннотированного гена *RPNIa*, выявил бэнды ожидаемого размера (рис. 21B), что подтверждает наличие «чистой» вставки в ген *RPNI*, которая не связана с делецией или другой генетической перестройкой (Page et al., 2004; Brukhin et al., 2011). Субклонирование этих ПЦР-фрагментов и их последующее секвенирование показали, что вставка *Ds* расположена в стартовом кодоне ATG (между нуклеотидами T и G) первого экзона *RPNIa* (рис. 21A).

Блоттинг геля геномной ДНК показал, что в линии SGT4227 присутствует только одна вставка *Ds*-элемента, что позволило нам использовать маркер устойчивости к канамицину для дальнейших генетических характеристик. Сегрегационный анализ потомства самоопыленных гетерозиготных растений показал, что чувствительные к канамицину проростки относительно неустойчивых к канамицину расщеплялись в соотношении 2:1 (таблица 5), что свидетельствует об эмбриолетальности, вызванной гомозиготной вставкой *Ds*-элемента, и/или указывает на сниженную трансмиссию мутации через гаметофиты. Чтобы определить, нормально ли передается вставка как через мужские, так и через женские гаметофиты, проводили реципрокные скрещивания с диким типом. Было

обнаружено, что эффективность передачи маркера устойчивости к канамицину через оба гаметофита является нормальной (таблица 5) (Howden et al., 1998; Brukhin et al. 2005b; 2011).

Все вышесказанное указывает на то, что линия SGT4227 несет эмбриолетальную мутацию, сцепленную с *Ds*-элементом. Чтобы

Таблица 5 - Коэффициент сегрегации и эффективность передачи гена *NPTII*, придающего устойчивость к канамицину мутантам линии SGT4227

Скрещивание	Kan ^r	Kan ^s	Total	Значение P	TE _F	TE _M
SGT4227 самоопыление	915	470	1385	0.63	NA	NA
SGT4227/- × WT	61	62	123	0.93	98%	NA
WT × SGT4227/-	88	76	164	0.35	NA	100%

*WT – дикий тип

Эффективность трансмиссии была рассчитана в соответствии с Howden et al. (1998): $TE = \text{Kan}^r / \text{Kan}^s \times 100\%$; Kan^r – устойчивые к канамицину проростки; Kan^s – проростки, чувствительные к канамицину; Значение P, основанное на ожидаемом коэффициенте сегрегации Kan^r: Kan^s 2:1 или 1:1 соответственно; TE_F - женская эффективность передачи; TE_M - мужская эффективность передачи. NA - не применимо. Brukhin et al. 2005b.

подтвердить, что зародыши линии SGT4227, гомозиготные по инсерции, абортируются, мы проанализировали зрелые стручки на наличие нежизнеспособных семян (рис. 21С). Действительно, было обнаружено, что в зрелых стручках 24% семян были абортированы, что указывает на почти полную пенетрантность летального фенотипа зародыша (таблица 6).

Для гена *RPN1b* мы идентифицировали и проанализировали три инсерционных линии из коллекции SALK (Alonso et al., 2003): SALK_115981 и SALK_061211 со вставками Т-ДНК в экзонах 5 и 17 соответственно и SALK_023490 со вставкой Т-ДНК в промоторную область *RPN1b* (обозначенные как *rpn1b-1*, *rpn1b-2* и *rpn1b-3* соответственно на рис. 21А). Фенотип всех этих трех линий соответствовал фенотипу дикого типа, а проанализированные стручки

показали полную завязываемость семян. Поскольку инсерции в гене *RPN1b* не обнаруживали каких-либо очевидных фенотипов, мы сосредоточили дальнейшие исследования на предполагаемой мутации в гене *RPN1a*.

Таблица 6 -Abortивность семян у растений, несущих разные аллели *rpn1a*.

Аллель	Нормальных семян	Абортированных семян	N проверенных семян	Значение P
<i>rpn1a-1</i>	76.0%	24.0%	n = 1016	0.47
<i>rpn1a-2</i>	77.6%	22.4%	n = 459	0.20
<i>rpn1a-3</i>	72.2%	27.8%	n = 654	0.11

Зрелые стручки были проанализированы на наличие недоразвитых семян. Значение P, равное $\geq 0,05$, считалось соответствующим гипотезе о том, что 25% семян абортируются, как и ожидалось для зиготической эмбриональной летальной мутации. (Brukhin et al. 2005b).

4.1.3 Нарушение гена *RPN1a* вызывает зиготическую эмбриолетальность

Характеристика линии SGT4227 показала, что ген *RPN1* может иметь важное значение для нормального развития зародышей растений. Чтобы продемонстрировать причинно-следственную связь между инсерцией *Ds* в *RPN1a* и наблюдаемым фенотипом, мы провели дальнейший анализ косегрегации и использовали два дополнительных генетических подхода: фенотипическую реверсию предположительно индуцированной транспозоном мутации и исследование дополнительных мутантных аллелей. Анализ >250 гетерозиготных растений линии SGT4227 показал, что маркер устойчивости к канамицину и летальность зародышей строго косегрегируют. Таким образом, *Ds*-элемент был тесно связан с эмбриолетальной мутацией, присутствующей в линии SGT4227. Хотя косегрегация фенотипа с инсерцией предполагает, что *Ds*-элемент может вызывать летальность зародыша, однако это не является окончательным доказательством. Чтобы продемонстрировать причинно-следственную связь, мы

произвели попытку вернуть дикий фенотип путем ремобилизации *Ds* транспозона в линии SGT4227 путем ее скрещивания со стабильной линией *Ac*, продуцирующей *Ac*-транспозазу (Sundaresan et al., 1995). В этих скрещиваниях использовали разные линии *Ac*, поскольку иногда наблюдается эпигенетическое молчание *Ac*-транспозазы (Брюхин, Гроссниклаус, неопубликованные результаты). Из 24 проанализированных мутантных растений 9 растений, полученных в результате скрещивания гетерозигот SGT4227 с мужскими и женскими родителями *Ac4/Ac4* или *Ac5/Ac5* соответственно, были мозаичными. Как показано на рис. 22А, эти растения продуцировали сегменты как дикого типа, так и мутантные сегменты. Некоторые секторы дикого типа охватывают всю вторичную ветвь растения. Тот факт, что ремобилизация *Ds* элемента в *RPN1a* восстанавливает фенотип дикого типа, убедительно свидетельствует о том, что нарушение гена *RPN1a* вызывает гибель эмбрионов. Поэтому линия SGT4227 была обозначена как *rpn1a-1*.

Для подтверждения реверсии на молекулярном уровне была выделена ДНК как из мутантных, так и диких участков одного и того же растения. Геномную ДНК из *rpn1a-1*, а также мутантных и диких участков гибридного растения амплифицировали с использованием праймеров, специфичных для встроенного в аллель *rpn1a-1* *Ds*-элемента (рис. 22В, фрагмент 750 п.н. на дорожках 1 и 3) или праймеров, специфичных для *Ds*-элемента (рис. 22В, фрагмент 1146 п.н. на дорожках 2, 4 и 6). В то время как *Ds*-элемент был обнаружен во всех образцах, бэнд, специфичный для *rpn1a-1*, не обнаруживался в ревертированном секторе, подтверждая, что *Ds*-элемент был удален из гена *RPN1a* (Brukhin et al. 2005b).

Для определения молекулярной природы ревертантной аллели, мы сначала секвенировали 3' и 5' концы, фланкирующие инсерцию *Ds*-элемента. Как это часто бывает при инсерции *Ds*-элемента, образуется прямая таргетная дупликация размером 8 п.н. (рис. 22С). Таргетная дупликация привела к нарушению 5' нетранслируемой области на 6 п.н. выше вновь возникшего АТГ. Для обнаружения

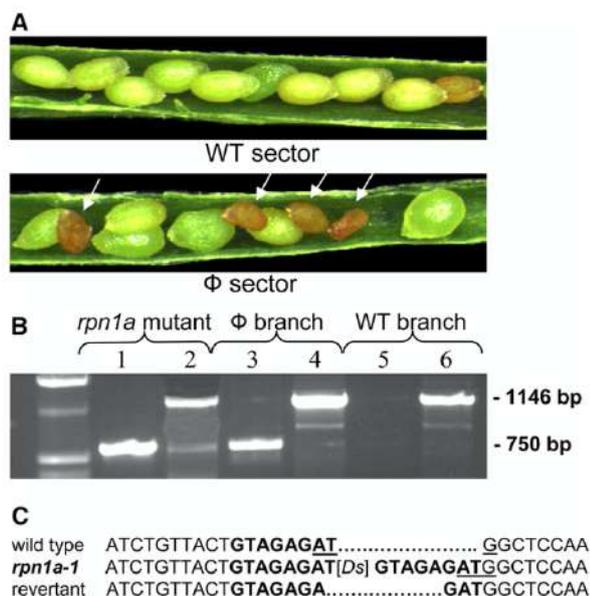


Рисунок 22 - Анализ ревертантных секторов мутанта *rpn1a-1*.

(А) Фенотип мозаичного гибридного растения, полученного в результате скрещивания женской линии (завязь) Ас4/Ас4 с мужской линией (пыльца) *rpn1a-1/RPN1a*, демонстрирующий стручки как дикого типа (верхняя панель), так и фенотипический сектор с абортрованными семенами (стрелки, нижняя панель).

(В) ПЦР-анализ геномной ДНК из фенотипического сектора (дорожки 3 и 4), сектора дикого типа (дорожки 5 и 6) и контрольного растения *rpn1a-1/RPN1a* (дорожки 1 и 2). Фрагмент размером 750 п.н., специфичный для вставки *Ds* в аллель *rpn1a-1*, отсутствует из-за вырезания *Ds*-элемента (дорожка 5); фрагмент 1146 п.н., специфичный для *Ds* элемента, присутствует во всех показанных образцах. (С) Последовательности ДНК, фланкирующие инсерцию *Ds* у *rpn1a-1*, что создает типичную прямую дупликацию сайта-мишени размером 8 п.н. Стартовый кодон АТГ подчеркнут. В ревертантной аллели в позиции слияния 5' один нуклеотид был делетирован и в позиции слияния 3' пять нуклеотидов были делетированы, оставляя типичный след *Ds*-элемента размером 2 п.н. Удаление большой вставки позволило восстановить функцию *RPN1a* (Brukhin et al. 2005b).

ревертантной аллели из ДНК, выделенной из ревертантного сектора, были амплифицированы ПЦР-фрагменты, охватывающие сайт инсерции. Как и ожидалось для гетерозиготного растения, приблизительно половина (6) секвенированных клонов обнаружила последовательность дикого типа, а другая половина (4) – ревертантную последовательность. В ревертантной аллели один нуклеотид был делетирован в месте слияния 5' и пять в месте слияния 3', оставляя типичный след (футпринт) *Ds*-элемента (Rinehart et al., 1997), вставку из двух нуклеотидов (рис. 22С). Вырезание удалило большую инсерцию непосредственно перед стартовым кодоном ATG, восстановив функцию *RPN1a*, о чем свидетельствует фенотипическая реверсия в этом секторе.

Чтобы определить, является ли эмбриолетальный фенотип *rpn1a-1* репрезентативным для мутаций в этом гене и представляет ли собой нулевой фенотип, мы исследовали дополнительные мутантные аллели. В коллекции SALK мы обнаружили две линии со вставками Т-ДНК в гене *RPN1a* (рис. 21А): SALK_12604 несет инсерцию во втором экзоне (*rpn1a-2*), а SALK_30503 содержит инсерцию Т-ДНК на 300 п.н. выше кодирующей области *RPN1a* (*rpn1a-3*). Генотипирование этих линий на основе ПЦР подтвердило правильность аннотированных сайтов инсерции. Фенотипы этих линий характеризовали с помощью оценки abortивности семян в зеленых стручках (табл. 5). Растения, гетерозиготные по двум новым аллелям, продуцировали 22,4 и 27,8% abortированных семян, соответственно, что согласуется с мутациями, вызывающими гибель зародыша в гомозиготном состоянии. Сходство фенотипов по уровню дефектных семян и цитологии (см. ниже) позволяет предположить, что летальность зародышей у мутантов *rpn1a*, вероятно, представляет собой нулевой фенотип. Таким образом, рассмотренные генетические анализы убедительно свидетельствуют о том, что активность *RPN1a* необходима для нормального эмбриогенеза (Brukhin et al. 2005b).

4.1.4 Зародыши, гомозиготные по мутациям в *RPN1a* останавливают свое развитие на глобулярной стадии

Для определения дефектов развития гомозиготных зародышей *rpn1a* на цитологическом уровне проводилось исследование просветленных семян (рис. 23А и 23В) и срезов (рис. 23С-23F) под световым микроскопом. Анализ просветленных

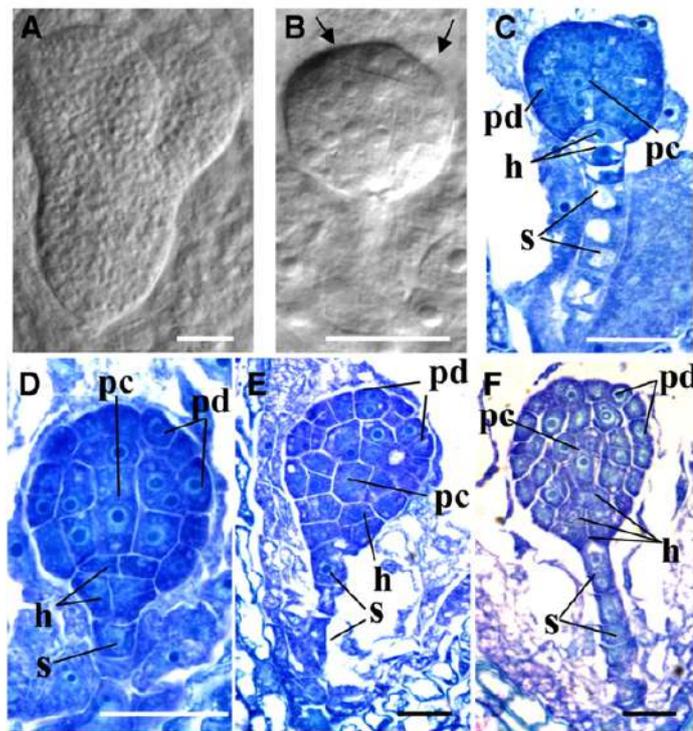


Рисунок 23 - Развитие семян и зародышей у растений *rpn1a-1/RPN1a*.

(А) и (В) Просветленные семена из одного и того же стручка: стадия торпеды семени дикого типа (А), абортное семя с зародышем, остановившим развитие на глобулярной стадии (В). Неравномерный слой протодермы (стрелки). (С–F) Окрашенные толуидиновым синим срезы зародыша дикого типа на ранней глобулярной стадии (С) и мутантные зародыши *rpn1a-1* с аномалиями на глобулярной стадии (D–F). h — производные гипофизарной клетки; pc, прокамбиальные клетки; pd, протодерма; s, суспензор. Масштабная линейка 25 мкм (А) и 50 мкм (В - F) (Brukhin et al. 2005b).

препаратов показал, что стручки, содержащие семена с зародышами дикого типа на стадии торпеды (рис. 23А) также содержали 25% семян с мутантными зародышами *rpn1a-1/rpn1a-1*, остановившими свое развитие на глобулярной стадии (рис. 23В). Эту же стадию остановки наблюдали и в мутантных линиях *rpn1a-2* и *rpn1a-3*. Поэтому дальнейший анализ был сосредоточен на аллели *rpn1a-1*. Развитие зародыша в семенах мутанта *rpn1a-1* явно отклонялось от нормального *Onagrad*-типа эмбриогенеза, характерного для семейства Brassicaceae (Johansen, 1950). Остановка эмбриогенеза происходила преимущественно на глобулярной стадии (рис. 23А и 23В), при эмбриогенезе наблюдалось (1) преждевременное деление гипофизарной клетки (отличия мутантного зародыша на рис. 23D и зародыша дикого типа на рис. 23С, оба зародыша происходят из одного и того же стручка), (2) недоразвитие, менее вакуолизированные суспензорные клетки (рис. 23D и 23Е), (3) аномалии формирования протодермы (рис. 23В и 23D–23F) и (4) аномалии деления прокаμβиальных клеток (рис. 23D–23F). Более того, клетки мутантных зародышей *rpn1a-1* выглядели менее плотно прилегающими друг к другу, чем у зародышей дикого типа, о чем свидетельствуют большие апопластические пространства между клетками (рис. 23D–23F) (Brukhin et al. 2005b).

С целью сравнения хода развития мутантных и диких зародышей цветки, как мутантных, так и диких растений, опыляли вручную собственной пылью, затем просветленные препараты исследовали под оптикой с дифференциальным интерференционным контрастом (DIC) на 1, 2, 3, 4 и 5 день после опыления (ДПП); табл. 3). В целом, развитие зародышей у мутантных растений *rpn1a* было несколько замедленным и менее синхронным, чем у растений дикого типа. В стручках гетерозиготных мутантов *rpn1a-1* уже на 1 ДПП число зародышей на двух-четырёхклеточной стадиях увеличилось на 14% по сравнению со стручками растений дикого типа при одновременном снижении числа зародышей на стадии от октанта до дерматогена (образования зародышевого эпидермиса) на 13%. На этом раннем этапе выявляются и первые отклонения от нормального онтогенеза. В то время как зародыши дикого типа имеют суспензор, состоящий из семи-восьми клеток, у

мутантов *rpn1a-1* суспензор состоит только из двух-пяти клеток. Как только глобулярный зародыш дикого типа достигает 32-х клеток (от 2 до 3 ДПП), самая верхняя суспензорная клетка внедряется в собственно зародыш, превращаясь в так называемую гипофизарную клетку, которая делится один раз периклинально, а затем остается митотически инертной до тех пор, пока не произойдет ее дальнейшее деление на сердечковидной стадии развития зародыша. Однако у мутантных зародышей из того же стручка гипофизарная клетка уже претерпевала два или более делений. Производные гипофизарной клетки мутантных зародышей содержали более плотную цитоплазму, были крупнее, чем производные гипофизарной клетки гипофиза у зародышей дикого типа, а плоскости их деления были менее регулярными (Рис. 23D). На этой же стадии из внутренних зародышевых клеток формируется прокамбий. У зародышей дикого типа наблюдаются восемь узких прокамбиальных клеток, расположенных в два слоя непосредственно над двумя производным гипофизарных клеток. Напротив, у мутантных зародышей *rpn1a* в том же стручке наблюдалась только одна или две удлиненные прокамбиальные клетки, расположенные апикально по отношению к множественным производным гипофизарных клеток (ср. рис. 23С и 23D). Несмотря на эти аномалии, мутантные зародыши развивались дальше, пока не остановили развитие преимущественно на глобулярной стадии, о чем свидетельствует тот факт, что на 4-й и 5-й ДПП количество глобулярных зародышей увеличивалось на 21 и 28% соответственно в стручках гетерозиготных мутантов *rpn1a-1* по сравнению с диким типом (табл. 7) (Brukhin et al. 2005b).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что гомозиготные по аллели *rpn1a* зародыши задерживают развитие и обнаруживают аномальные паттерны клеточных делений, ведущие к менее синхронизированному развитию семян. Дефекты, наблюдаемые у мутантных зародышей *rpn1a-1*, указывают на то, что ген *RPN1a* участвует в регуляции плоскостей клеточных делений, так как мы наблюдали неравномерно ориентированные деления в протодермальных и прокамбиальных клетках у мутантных зародышей *rpn1a-1*. Более того, *RPN1a*, по-видимому, одновременно способствует клеточной

пролиферации (например, в гипофизе и протодерме, где наблюдались дополнительные деления у мутантных зародышей) и ограничивает клеточную пролиферацию, о чем свидетельствует уменьшенное количество делений суспензорных и прокаμβиальных клеток.

Таблица 7 - Прогрессия эмбриогенеза у растений дикого типа и гетерозиготных по *rpn1a* растений.

ДАП	Зигота	Первое деление	Двух- и четырех-клеточный зародыш	Оконт-стадия дерматогена	Глобулярный зародыш	Ранний сердечковидный зародыш	Поздний сердечковидный зародыш	Торпедовидный зародыш	№. семян проверено
Растения дикого типа									
1	6%	7%	29%	58%	–	–	–	–	144
2	5%	–	9%	53%	33%	–	–	–	92
3	2%	–	1%	5%	38%	54%	–	–	191
4	2%	–	–	–	14%	33%	51%	–	111
5	–	–	–	–	–	13%	36%	51%	124
<i>rpn1a</i> гетерозиготные растения									
1	5%	7%	43%	45%	–	–	–	–	130
2	5%	2%	18%	54%	21%	–	–	–	136
3	2%	–	2%	26%	42%	28%	–	–	235
4	2%	–	1%	7%	35%	47%	8%	–	119
5	–	–	–	–	28%	9%	7%	56%	53

Цветки мутантных и диких растений опыляли собственной пыльцой, фиксировали на 1, 2, 3, 4 и 5 ДПП, просветляли хлоралгидратом и наблюдали под оптикой DIC. Из Brukhin et al. 2005b.

4.1.5 У мутантных зародышей *rpn1a* наблюдались дефекты прогрессии клеточного цикла

Для более полной характеристики фенотипа зародышей мутантов *rpn1a-1*, мы проанализировали возможное влияние мутации на ход клеточного цикла. Мутант *rpn1a-1* скрещивали с маркерной линией, экспрессирующей белок циклин B1;1 слитый с β-глюкуронидазой (GUS). Известно, что циклин B1;1, необходимый

для митоза, экспрессируется только во время перехода стадий G2/M клеточного цикла (Colon-Carmona et al., 1999). Гибридный белок содержал блок разрушения циклина, который вызывал деградацию белка в конце M-фазы (de Almeida Engler et al., 1999; Donnelly et al., 1999). В молодых семенах вскоре после оплодотворения происходят многочисленные митотические деления и обнаруживался повышенный уровень активности циклина B1;1-GUS. Часть зародышей демонстрировала высокий уровень окрашивания на этой стадии (рис. 25R), что согласуется с наблюдаемыми фенотипами остановки развития зародышей на ранних стадиях. На более позднем этапе развития у 75,2% зародышей (n = 351) экспрессия циклина B1;1-GUS не наблюдалась, либо была очень слабой (рис. 25Q), как правило, с окрашиванием всего нескольких отдельных клеток. Напротив, 24,8% зародышей накапливали высокий уровень белка циклина B1;1-GUS (рис. 25R). Эти зародыши останавливались на глобулярной стадии развития и, таким образом, представляли собой гомозиготные мутанты *rpn1a-1* (Brukhin et al. 2005b).

Полученные данные указывают на то, что деградация циклина B1;1-GUS не происходит у эмбрионов гомозиготных по *rpn1a-1*, и позволяют предположить, что возможно клетки блокируются в фазе G2/M клеточного цикла, когда уровень белка циклина B1;1 особенно высокий.

4.1.6 Гены *RPNI* экспрессируются как в вегетативных, так и репродуктивных органах.

Для получения представления о пространственном и временном характере экспрессии генов *RPNI*, мы провели количественную ОТ-ПЦР с РНК, выделенной из листьев, стеблей, цветочных почек, открытых цветков и стручков на трех стадиях развития (рис. 24А). Оба гена *RPNI* экспрессируются во всех исследованных органах, однако они демонстрируют более высокий уровень экспрессии в тканях стебля и стручках, содержащих семена с зародышами примерно на глобулярной стадии. Привлекает внимание и то, что во всех

проанализированных тканях уровень экспрессии *RPN1a* в три-пять раз выше, чем у *RPN1b*.

Учитывая, что ген *RPN1a* обильно экспрессируется в репродуктивных тканях, а мутанты *rpn1a* демонстрируют дефектный эмбриогенез, мы решили определить характер его экспрессии на клеточном уровне в развивающихся цветках и семенах. С этой целью были проведены эксперименты по гибридизации *in situ* на срезах цветочных почек и стручков с использованием специфичных для *RPN1a* антисмыслового и смыслового (контрольного) зондов (рис. 25). Паттерн экспрессии *RPN1a* можно резюмировать следующим образом: транскрипты были обнаружены в цветочной меристеме и примордиях цветка, которые показали несколько более высокий уровень экспрессии в адаксиальной части примордиев (рис. 25А и 25В). На ранних стадиях развития цветка транскрипты обнаруживались по всей цветочной меристеме с более низким уровнем экспрессии в чашелистиках. Особенно сильные гибридизационные сигналы наблюдали в формирующихся примордиях (рис. 25В). Позже был обнаружен заметный сигнал в развивающихся плодолистиках, особенно в примордиях семязачатков (рис. 25С). После оплодотворения экспрессия *RPN1a* наблюдалась в зародыше (рис. 25Е-25L) и халазальной части эндосперма (рис. 25М). На начальных стадиях развития семян, например, на стадии октанта (рис. 25Е) и глобулярной стадии (рис. 25G), интенсивность гибридизационного сигнала была высокой, однако она постепенно снижалась на более поздних стадиях (рис. 25I–25L). Начиная с поздней сердечковидной стадии (рис. 25I) уровень транскрипта *RPN1a* у зародыша становился низким, а сигнал, полученный с помощью антисмыслового зонда, был лишь немного сильнее, чем у смыслового

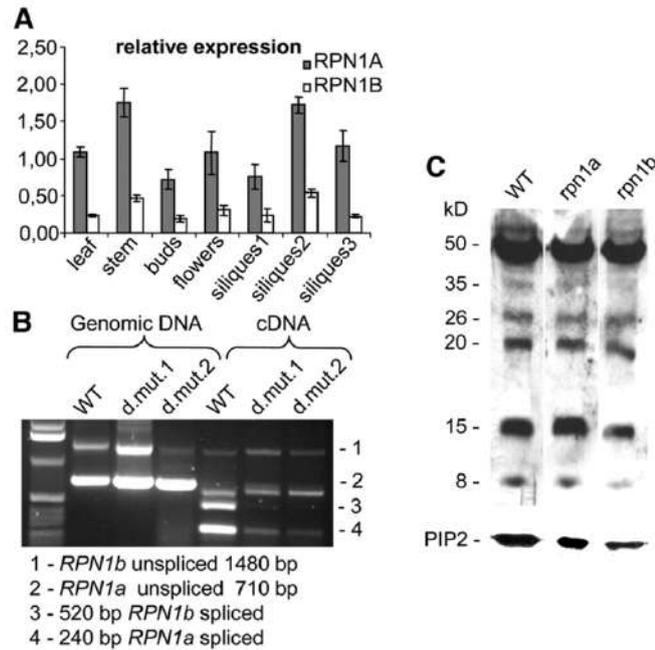


Рисунок 24 - Экспрессия и функция генов *RPN1* у мутантов и растений дикого типа.

(A) Относительное накопление транскриптов *RPN1a* и *RPN1b* в тканях растений дикого типа. Оба транскрипта были обнаружены в вегетативных и репродуктивных органах. В тканях всех исследованных органов *RPN1a* демонстрировал более высокие уровни экспрессии, чем *RPN1b*. Данные представлены как значения относительно экспрессии *18S* РНК. Идентичные результаты были получены с использованием *ACTIN1* в качестве эталонного гена (данные не показаны). Столбики погрешностей представляют стандартное отклонение (SD) на основе трех биологических повторов. (B) ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *RPN1a* и *RPN1b* у двойных мутантов, гетерозиготных по *rpn1a-1* и гомозиготных по *rpn1b-2* и *rpn1b-3* аллелям соответственно (здесь они обозначены как d.mut.1 и d.mut.2). У двойных мутантов мРНК *RPN1b* не обнаруживается, а уровни мРНК *RPN1a* снижены по сравнению с растениями дикого типа, вероятно, благодаря гетерозиготности. (C) Полиубиквитинированные белки в стручках дикого типа, мутантов *rpn1a/RPN1a* и *rpn1b/rpn1b*. Общий белок разделяли на геле и переносили на мембрану, а полиубиквитинированные белки выявляли с помощью

поликлональных антиубиквитиновых антител. Нижняя панель показывает белок плазматической мембраны AtPIP2b, использованный в качестве контроля. Положение маркера молекулярной массы показано слева (в кД). (Brukhin et al. 2005b).

контроля (рис. 25J). Тем не менее, вплоть до стадии торпедо и трости в зародыше отмечали несколько более высокие гибридизационные сигналы с антисмысловым зондом (рис. 25K), по сравнению со смысловым зондом (рис. 25L). Сигнал также наблюдался в развивающейся семенной оболочке, перегородке стручка (септе), а также довольно сильный сигнал обнаруживался в стенке стручка (рис. 25M и 25O) (Brukhin et al. 2005b).

В тычинках высокий уровень транскриптов *RPN1a* был обнаружен в пыльниках, но не в тычиночных нитях. Сильный сигнал гибридизации наблюдали в спорогенных клетках, а затем в тетрадах микроспор (рис. 25P), тогда как в париетальных и тапетальных тканях были обнаружены только фоновые уровни сигнала. После высвобождения пыльцы из тетрад гибридизационный сигнал был очень слабым в свободных микроспорах и едва превышал фон в трехклеточной пыльце.

Анализ EST *RPN1b* из разных тканей свидетельствует о том, что этот ген также широко экспрессируется, возможно, перекрываясь с паттерном экспрессии *RPN1a*. Для визуализации характера экспрессии паралогичного гена *RPN1b* в цветках и семенах, были проведены эксперименты по гибридизации *in situ* с использованием зонда, специфичного для *RPN1b*. Анализ гибридизации на срезах цветочных почек и семян на различных стадиях развития показал следующие результаты: транскрипты *RPN1b* были обнаружены по всему цветку с более сильными сигналами в плодолистиках, особенно в дифференцирующихся семязачатках и стенке плодолистика (рис. 26A). Сигнал был мозаичным и очень сильным в определенных клетках. Подобные точечные паттерны типичны для генов, регулирующих клеточный цикл (Fobert et al., 1994; Lukowitz et al., 1996), что может отражать дифференциальную регуляцию *RPN1b* во время клеточного цикла.

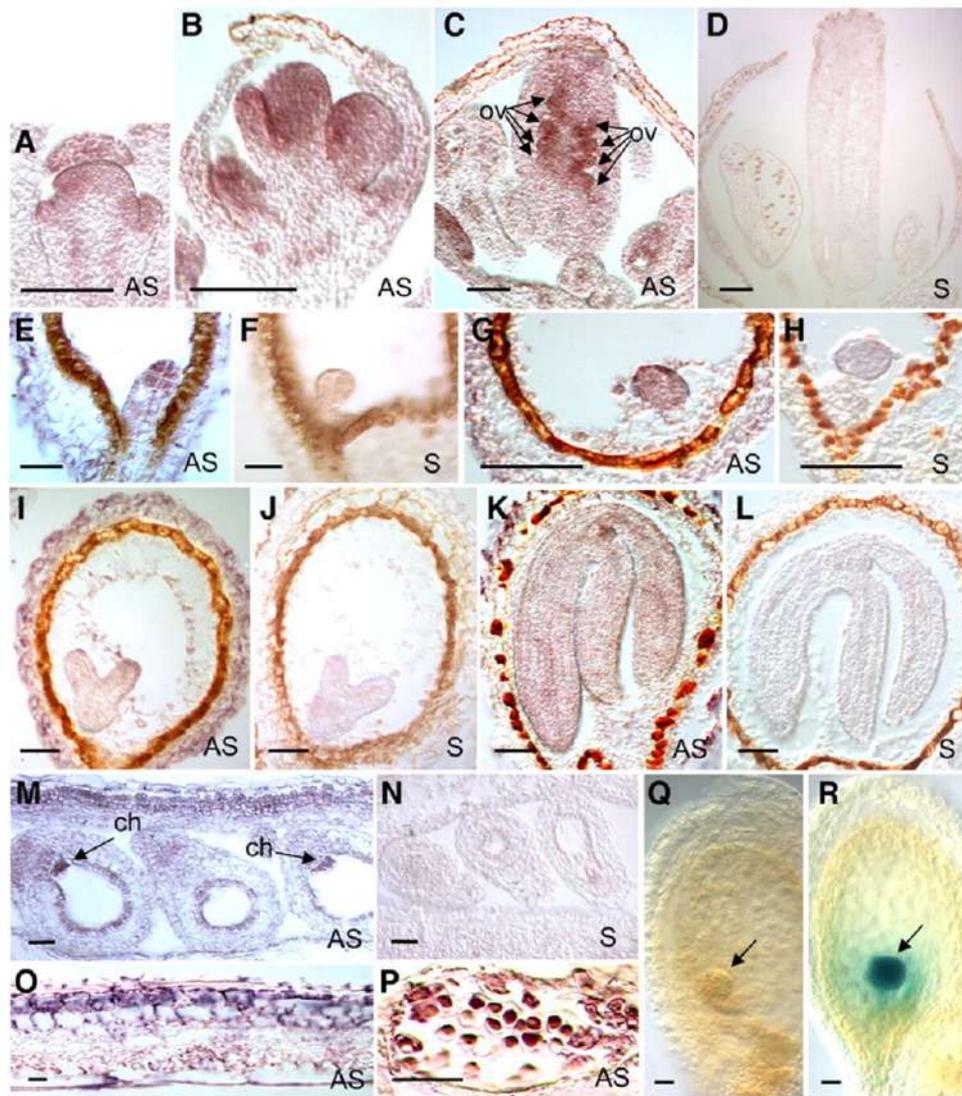


Рисунок 25 - Детекция мРНК *RPN1a in situ* в развивающихся цветках, семенах, стручках и экспрессия циклина B1;1 у мутанта *rpn1a-1*.

(A)–(D) Продольные срезы цветочной меристемы и цветочных почек на разных стадиях развития. (E) и (F) Зародыш на стадии октанта. (G) и (H) Зародыш на глобулярной стадии. (I) и (J) Зародыш на поздней сердцевидной стадии. (K) и (L) Зрелый зародыш. (M) – (O) Фрагмент стручка. (P) Тетрады микроспор. Сигнал гибридизации проявляется в виде темного окрашивания. (Q) Зародыш, несущий по крайней мере одну аллель *RPN1a* дикого типа. Гибридный белок циклин B1;1-GUS деградирует и едва обнаруживается в зародыше (указано стрелкой). (R) Гомозиготный мутантный зародыш *rpn1a-1* из того же стручка, что и в (Q), накапливает слитый белок циклинB1; 1-GUS (указано стрелкой). AS,

антисмысловой зонд; S, смысловой зонд; ch, халаза; ov, семязачатки. Масштабная линейка = 25 мкм в (A), (B), (E) до (H), (O) и (P) и 50 мкм в (C), (D) и (I) - (N). (Brukhin et al. 2005b).

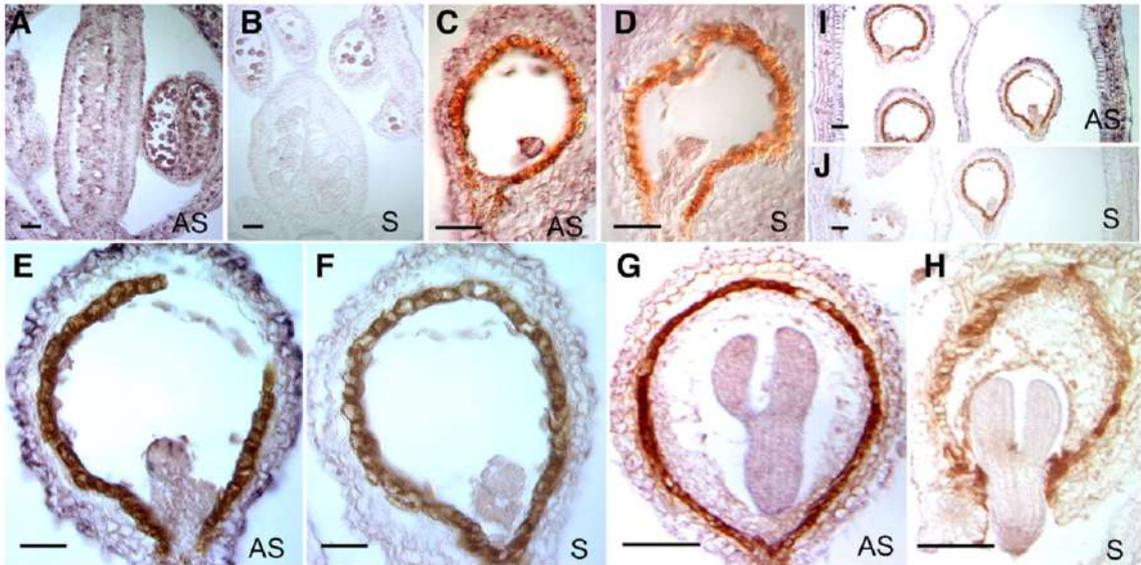


Рисунок 26 - Детекция мРНК гена *RPN1b in situ* в формирующихся цветках, семенах и стручках. (A) и (B) Продольные срезы цветка. (C) и (D) Зародыш на стадии октанта.

(E) и (F) Зародыш на глобулярной стадии. (G) и (H) Зародыш на стадии торпеды. (I) и (J) Фрагмент стручка. Гибридизационный сигнал проявляется в виде темного окрашивания. AS, антисмысловой зонд; S, смысловой зонд (контроль). Масштабная линейка = 25 мкм в (C) – (F) и 50 мкм (A), (B) и (G) – (J). Brukhin et al. 2005b.

В пыльниках высокий уровень транскриптов был обнаружен в тетрадах микроспор и в клетках тапетума (рис. 26А). После оплодотворения наиболее сильный сигнал наблюдался в зародыше до сердцевидной стадии (рис. 26С-26F), а также в халазальной части эндосперма (рис. 26I). Начиная с поздней сердцевидной стадии количество транскриптов *RPN1b* в зародыше сильно понижалось, а гибридизационный сигнал с антисмысловым зондом был лишь

немного сильнее сигнала, наблюдаемого в контроле со смысловым зондом (рис. 26G и 26H). Слабый сигнал наблюдался и в развивающейся семенной кожуре и перегородке плода, в то время как стенка стручка демонстрировала высокий уровень экспрессии на всех стадиях развития плодолистика (рис. 26I) (Brukhin et al. 2005b).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в развивающихся цветках и семенах паралоги *RPN1* экспрессируются по-разному, но в значительной степени перекрываются. Уровни экспрессии высоки на ранних стадиях эмбриогенеза (но не ограничиваются ими), когда у мутантов *rpn1a* наблюдается задержка развития.

4.1.7 Гены *RPN1a* и *RPN1b* не имеют дублирующих функций

Анализ паттернов экспрессии генов *RPN1a* и *RPN1b* показал, что эти паралогичные гены экспрессируются частично перекрывающимся образом и, следовательно, могут функционировать избыточно. Генетический анализ выявил, что мутации в *RPN1a* приводят к гибели зародышей, в то время как мутанты *RPN1b* не обнаруживают очевидных фенотипов. Поскольку протеасома играет решающую роль в контроле клеточного деления, мы были удивлены тем, что развитие гаплоидных гаметофитов, которые претерпевают два или три митотических деления соответственно, не было затронуто у мутантов *rpn1a*. Это может быть связано либо с (1) частичной потерей функции у изученных нами аллелей *rpn1a*, (2) устойчивостью белка *RPN1a* или протеасомных частиц в течение нескольких циклов клеточного деления, либо (3) генетической избыточностью между *RPN1a* и *RPN1b*. Чтобы разобраться в этих вариантах, мы сначала определили, являются ли изученные нами аллели *rpn1a* и *rpn1b* нулевыми. Демонстрация этого момента имеет решающее значение для интерпретации фенотипов двойных мутантов, которые предоставляют информацию о функциональной избыточности.

Поскольку мутации в *RPN1a* являются летальными в гомозиготном состоянии, было невозможным проанализировать уровни экспрессии этого гена в

мутантах с помощью обычных методов, таких как ОТ-ПЦР. Поэтому мы провели эксперименты по гибридизации *in situ* на срезах развивающихся семязачатков и семян гетерозиготного растения *rpn1a-1/RPN1a-1*. Были проанализированы семена вплоть до глобулярной стадии и обнаружено, что 26,9% семян ($n = 67$) не давали детектируемого сигнала при использовании *RPN1a*-специфического антисмыслового зонда (данные не показаны), в то время как контроль (семена дикого типа) показал четкий сигнал на стадии глобулярного зародыша. В оставшихся 73,1% семян, которые, вероятно, соответствуют гетерозиготам по *RPN1*, сигнал был обнаружен с помощью антисмыслового зонда *RPN1a*. Материнские ткани, такие как кожура семян и стенки плодолистика, демонстрировали интенсивность сигнала, сравнимую с диким типом.

Для характеристики мутантов *rpn1b* на молекулярном уровне, мы провели ОТ-ПЦР, чтобы выяснить, действительно ли вставки Т-ДНК создают нулевые аллели, как предполагалось. Как показано на рисунке 24В, экспрессия *RPN1b* не может быть обнаружена в цветках двух двойных мутантных линий, которые были гетерозиготными по *rpn1a-1* и гомозиготными по *rpn1b-2* или *rpn1b-3* соответственно. Эти исследования убедительно свидетельствуют о том, что используемые нами аллели *rpn1a* и *rpn1b* действительно нулевые аллели, не обеспечивающие остаточной активности *RPN1*.

Чтобы выяснить, являются ли два паралогичных гена *RPN1* функционально избыточными, мы проанализировали абортивность семян и летальность зародышей у двойных мутантов, описанных выше. Не было обнаружено существенной разницы в проценте абортированных семян, если в дополнение к *rpn1a* был мутирован и *rpn1b* (23% абортированных семян в *rpn1a-1/RPN1a rpn1b-3/rpn1b-3*, $n = 846$ семян и 21% абортированных семян в *rpn1a-1/RPN1a rpn1b-1/rpn1b-1*, $n = 450$ семян), при этом остановка развития зародыша происходила на той же стадии, что и у одиночного мутанта *rpn1a-1*. Таким образом, двойной мутант не проявлял более сильного фенотипа (например, остановку развития мегагаметофитов или раннего эмбриогенеза). Это открытие убедительно свидетельствует об отсутствии функциональной избыточности между генами *RPN1a* и *RPN1b* в отношении

репродуктивного развития, где *RPN1a* играет решающую роль. Таким образом, субъединицы RPN1 протеасомы либо не играют существенной роли до глобулярной стадии эмбриогенеза, либо, что более вероятно, *RPN1a* является достаточно стабильным и обильным белком, сохраняющимся после мейоза в течение нескольких циклов деления в гаметофитах и в период раннего развития семян.

Для выявления возможных функциональных различий между паралогичными генами *RPN1*, мы исследовали общий уровень убиквитинирования в стручках, содержащих глобулярные зародыши. В отсутствие функциональных протеасом 26S должно увеличиваться количество и/или уровень полиубиквитинированных белков. Полиубиквитинированные белки анализировали в растениях *rpn1a/RPN1a*, где гомозиготные мутантные зародыши возможно не расщепляют убиквитинированные субстраты, и в гомозиготах *rpn1b/rpn1b* (рис. 24С). Если у мутантов была нарушена функция протеасом, то это должно сказываться на уровне полиубиквитинированных белков, как это было описано, например, после применения ингибиторов протеасом 26S, сопровождавшееся резким повышением общего уровня полиубиквитинированных белков (Speranza et al. др., 2001). Хотя мутантные клетки *rpn1a* составляют лишь небольшую часть клеток, из которых были получены белковые экстракты, ожидается, что неспособность расщепить крайне нестабильные субстраты приведет к изменениям профиля полиубиквитинированных белков (например, появлению новых бэндов). Мы не обнаружили каких-либо различий в общем уровне полиубиквитинированных белков между двумя мутантами и растениями дикого типа. Эти данные указывают на то, что у мутантов функция протеасом в целом существенно не нарушена и что изоформы *RPN1* возможно имеют довольно специфические функции, приводящие к тонким изменениям. Также возможно, что мутанты *rpn1* влияют только на определенное подмножество специфических субстратов, а не на все полиубиквитинированные белки, и они не обнаруживаются проведенным анализом.

4.1.8 Две изоформы *RPNI* функционально эквивалентны

Вышеописанные эксперименты, доказывающие, что две изоформы *RPNI* не перекрываются во время репродуктивного развития, не касались, однако, вопроса, являются ли эти очень сходные паралогичные гены функционально эквивалентными. Несколько причин могут объяснить, почему ген *RPNIb* не может дополнять мутацию *rpn1a* во время гаметогенеза и эмбриогенеза, например различия в уровне или характере экспрессии двух генов. Более того, также возможно, что две изоформы *RPNI* имеют разные функции, например, в отношении субстратной специфичности.

Чтобы проверить, являются ли две изоформы *RPNI* функционально эквивалентными, мы попытались комплементировать (дополнить) мутант *rpn1a-1* конструкциями, экспрессирующими кДНК *RPNIa* или *RPNIb* под контролем промотора *RPNIa* (*pRPNIa*) соответственно. Кроме того, мы использовали сильный промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты (*p2x35S*) для запуска экспрессии *RPNIa*. Эксперименты по обмену промоторами показали, что все три конструкции могут комплементировать мутацию *rpn1a-1*, о чем свидетельствовало снижение уровня абортивности семян (таблица 8). Однако степень успешной комплементации варьировала у гетерозиготных растений *rpn1a*, несущих разные конструкции. Из 16 растений, трансформированных конструкцией *p2x35S-RPNIa*, 9 растений показали фенотип, сходный с *rpn1a* (около 25% абортивных семян), в то время как у 7 растений фенотип был частично восстановлен (абортивность семян варьировала от 15,6 до 2,5%). Из 15 растений, трансформированных конструкцией *pRPNIa-RPNIa*, только 2 растения обнаружили фенотип *rpn1a*, а у остальных 13 растений абортивность семян варьировала от 18 до 2%. Из 13 растений, трансформированных конструкцией *pRPNIa-RPNIb*, 7 растений демонстрировали фенотип *rpn1a*, а 6 растений имели пониженную абортивность семян в диапазоне от 11,7 до 1,7%. Различная степень нежизнеспособности семян, наблюдаемая у гетерозиготных растений *rpn1a*, несущих индивидуальные конструкции, вероятно, обусловлена расщеплением и количеством встроенных комплементарных

конструкций, а также их расположением на хромосомах. Для оценки количества комплементарных конструкций мы провели гель-блот анализ ДНК (данные не показаны) для трех независимых линий каждой конструкции, которые различались по уровню abortивности семян (таблица 8). Как ожидалось, у линии, несущей единственную копию комплементарной конструкции, количество abortированных семян в поколении T2 будет снижено до ~12,5%, если мутация *rpn1a* и комплементарная конструкция расщепляются независимо. Если линия имеет две независимо расщепляющиеся копии конструкции, то ожидается, что abortивность семян составит ~6,25% и т. д. В тестируемых нами линиях была обнаружена четкая тенденция – с увеличением количества комплементарных конструкций в геноме наблюдалась более низкая частота abortивности семян у соответствующего растения. (таблица 8). Например, в линиях с одной копией мы наблюдали 12,1 и

Таблица 8 - Abortивность семян у комплементированных мутантов *rpn1a-1/RPN1a*.

Конструкт комплементации	Растение	Нормальных семян	Abortированных семян	Всего семян оценено	Количество копий T-ДНК
<i>p2x35S-RPN1a</i>	16	94.8%	5.2%	224	3
	19	87.9%	12.1%	198	1
	21	86.0%	14.0%	262	3
<i>pRPN1a-RPN1a</i>	26	87.6%	12.4%	239	5
	27	92.0%	8.0%	191	2
	28	98.0%	2.0%	188	4
<i>pRPN1a-RPN1b</i>	29	94.7%	6.3%	202	4
	34	88.3%	11.7%	214	1
	35	98.3%	1.7%	226	6

Зрелые стручки анализировали на наличие недоразвитых семян. Количество копий вставок T-ДНК определяли с помощью гель-блоттинга ДНК. Из Brukhin et al. 2005b.

11,7% abortивных семян (растения 19 и 34), а в линиях с двумя и тремя копиями – 8 и 5,2% abortивных семян соответственно (растения 27 и 16). Наблюдаемые

показатели абортивности семян согласуются с наличием одной, двумя или тремя полностью комплементарными, независимо расщепляющимися комплементарными конструкциями (значения P в диапазоне от 0,12 до 0,83). Однако количество комплементационных конструкций не всегда коррелировало со снижением абортивности семян. Это может быть связано с положением вставки, сайленсингом гена или тандемной вставкой комплементационных конструкций (Brukhin et al. 2005b).

В совокупности эксперименты по обмену промоторами показывают, что две изоформы гена *RPNI* могут функционально заменять друг друга, если они экспрессируются под соответствующим промотором. Однако *in planta* эти два гена не действуют избыточно, по крайней мере, во время репродуктивной фазы развития.

4.2 Выводы

Протеасома 26S необходима для реализации множества клеточных процессов, которые контролируются селективной деградацией белков, меченных полиубиквитином (Voges et al., 1999; Vierstra, 2003; Brukhin et al., 2005b; Liu et al., 2020). Таким образом, протеасомы можно рассматривать как последнюю стадию жизненного цикла многих регуляторных белков. До недавнего времени считалось, что селективность убиквитин-26S-протеасомного пути зависит от реакции убиквитинирования, в которой убиквитинлигазы E3 играют ключевую роль в выборе субстрата, поскольку они именно они взаимодействуют с белковыми субстратами и присоединяют к ним убиквитиновые остатки (Ciechanover et al., 2000; Pickart, 2004). Однако ряд исследований заставляет предположить, что регуляторные частицы (RP) протеасомы 26S также могут способствовать этой специфичности (Vierstra, 2003; Mayor et al., 2005). Мутанты с нарушением функции отдельных субъединиц RP арабидопсиса, демонстрируют широкий спектр фенотипов, что согласуется с предположением, что каждая из них может участвовать в разрушении различных субстратов. Таким образом, протеасома 26S может

различать свои субстраты и, предположительно, использовать разные пути для их проникновения (van Nocker et al., 1996; Bailly, Reed, 1999; Smalle et al., 2002, 2003). Например, мутант с нарушением функции субъединицы RPN12a у *Arabidopsis thaliana* имеет пониженную чувствительность к цитокининам (Smalle et al., 2002). Также было показано, что субъединица RPT2a арабидопсиса необходима для поддержания клеточной организации апикальной меристемы корня и побега (Ueda et al., 2004). Нарушение гена RPN10 у мха *Physcomitrella patens* приводит к остановке развития (мутанты гена, кодирующего эту субъединицу, неспособны формировать почки и гаметофоры (Girod et al., 1999)). Кроме того, растения арабидопсиса, с мутированным геном *RPN10*, обнаруживали снижение скорости прорастания и роста, количества тычинок, генетической передачи через пыльцу и гормонозависимого деления клеток. Все это, вероятно, связано с подавлением регулятора клеточного цикла CDKA;1, наблюдаемым у мутантов *rpn10* (Smalle et al., 2003). Было показано, что у дрожжей мишенью субъединицы Rpn10 является регулятор клеточного цикла Sic1, который убиквитинируется комплексом SCFCdc4 при переходе стадий клеточного цикла G1/S, и далее расщепляется протеасомой 26S (Mayor et al., 2005). Более того, мутант *rpn10-1* способен содействовать нормальной деградации HY5 и PHUA, но резко стабилизирует регулятор ответа на абсцизовую кислоту ABI5, что демонстрирует, что *rpn10-1* влияет только на определённую группу субстратов протеасомы 26S (Smalle et al., 2003). На дрожжах было показано, что субъединица RPN10 способствует обороту регулятора клеточного цикла Sic1 и активатора транскрипции Gcn4 (Mayor et al., 2005).

У арабидопсиса большинство субъединиц RP кодируются двумя паралогичными субъединицами, что приводит к гипотезе, что растения могут синтезировать множественные формы протеасом 26S с уникальными свойствами и/или субстратной специфичностью (Yang et al., 2004).

Таким образом, для лучшего понимания функции субъединиц RP протеасомы 26S, мы исследовали одну из ее крупнейших субъединиц – RPN1, которая принадлежит к базовому комплексу RP и, как известно, физически

взаимодействует с двумя белками, несущими убиквитин-подобные домены, Rad23 и Dsk2 у дрожжей (Elsasser et al., 2002). Более того, субъединица RPN1 также связывает деубиквитирующий фермент Ubr6 (Leggett et al., 2002). У арабидопсиса мутации в убиквитин-специфической протеазе UBP14, которая, возможно, участвует в рециклировании полиубиквитиновых цепей после деградации, вызывают летальность зародыша на глобулярной стадии, но демонстрируют фенотип, отличный от *rpn1a* (Doelling et al., 2001; Tzafrir et al., 2002). Было предположено, что RPN1 может служить платформой для сборки белков, которые связывают или гидролизуют полиубиквитиновые цепи (Elsasser et al., 2004). Тем не менее, вмешательство в рециркуляцию полиубиквитина может иметь эффекты обратной связи для убиквитин-протеасомного пути. По этим причинам субъединица RPN1 может непосредственно участвовать в протеосомной регуляции и проявлять специфичность выбора мишени. В литературе упоминалось, что кодирующий ее ген крайне важен для почкующихся дрожжей (Hampton et al., 1996) и делящихся дрожжей (Wilkinson et al., 1997), однако, насколько известно, до наших исследований мутант *rpn1* не был описан у высших эукариот. Наиболее интересные результаты нашего исследования обнаружили (1) мутанты *rpn1* с потерей функции, которые были способны завершить гаметогенез и раннюю фазу эмбриогенеза, и (2) отсутствие функциональной избыточности между *RPN1a* и *RPN1b* в репродуктивном развитии, несмотря на функциональную эквивалентность двух изоформ RPN1.

4.2.1 Для нормального эмбриогенеза необходим *RPN1a*, но не *RPN1b*

У арабидопсиса было обнаружено два родственных гена, *RPN1a* и *RPN1b*, кодирующих субъединицу RPN1. Оба гена экспрессируются, и тот факт, что паттерны их экспрессии обнаруживают некоторые различия, указывает на то, что некоторые их функции не могут быть полностью перекрывающимися (Yang et al., 2004). Во время эмбриогенеза профили экспрессии обоих генов были очень сходными, что было выявлено с помощью гибридизации *in situ*. В семенах

обнаруживалась экспрессия как *RPN1a*, так и *RPN1b* с наиболее сильными сигналами в халазальной части эндосперма и зародыше вплоть до поздней глобулярной стадии. Далее, на сердечковидной стадии, стадии торпеды и зрелого зародыша сигналы гибридизация значительно снижалась и лишь немного превышали фоновый уровень. Наблюдаемые паттерны экспрессии предполагают, что гены *RPN1a* и *RPN1b* играют критическую роль во время раннего эмбриогенеза.

Наши наблюдения показали, что нарушение гена *RPN1a* вызывает гибель зародышей с абортивностью $\geq 25\%$ семян. Мутация *rpn1a* расщепляется как рецессивный моногенный признак. Эмбриональная летальность, вызванная нарушением структуры гена *RPN1a*, была подтверждена реверсией мутантного фенотипа после удаления транспозона, а также изоляцией двух дополнительных мутантных аллелей со сходным фенотипом. Развитие гомозиготных зародышей *rpn1a* блокируется на глобулярной стадии из-за отклонения от нормального паттерна эмбриогенеза Onagrad-типа, характерного для арабидопсиса и других Brassicaceae (Capron et al., 2009). Остановившие развитие зародыши не обнаруживали каких-либо признаков асимметричного роста, характерного для билатеральной дифференцировки (Laux, Jürgens, 1997). Цитологический анализ показал, что задержка развития зародышей *rpn1a* сопровождалась комбинацией нескольких дефектов, таких как преждевременное деление клеток гипофизиса, аномалии в суспензорной области и нарушения делений протодермы и прокамбиальных клеток. Следовательно, субъединица RPN1 может играть важную роль в контроле прогрессии клеточного цикла и дифференцировки во время эмбриогенеза (Brukhin et al., 2005b).

Одной из хорошо известных функций убиквитин-протеасомного пути растений является передача ауксиновых сигналов (Hellmann, Estelle, 2002). При этом ауксин способствует расщеплению определенных белков-репрессоров ауксина/индол-3-уксусной кислоты, которые, как считается, блокируют факторы ответа на ауксин. Ауксин, по-видимому, играет существенную роль при эмбриогенезе. У арабидопсиса мутант с потерей функции в ауксин-связывающем белке AVR1 останавливается на глобулярной стадии, при этом у зародыша не

происходит образования билатеральной симметрии (Chen et al., 2001). У гомозиготного мутанта *axr6* нарушено эмбриональное развитие, что сопровождается aberrantными паттернами деления клеток (Hobbie et al., 2000). Более того, мутанты, формирующие эмбриональный паттерн *bodenlos (bdl)* и *monopteros (mp)*, с нарушением в генах ауксина/индол-3-уксусной кислоты и фактора ответа на ауксин, соответственно, демонстрировали аномалии эмбриогенеза (Hardtke, Berleth, 1998; Namann и др., 2002). У мутантов *bdl* гипофизис развивается аномально (Namann et al., 1999). Хотя гомозиготные зародыши *bdl* не останавливают свое развитие на глобулярной стадии, фенотип *bdl* обнаруживает сходство с таковым у мутантных зародышей *rpn1a*: в гипофизисе происходят дополнительные периклиналильные деления, подтверждая, что BDL или другие белки, участвующие в передаче сигналов ауксина, могут быть субстратами RPN1a.

Другим мутантом, обеспечивающим возможную связь с развитием гипофизарных клеток и передачей сигналов ауксина, является *hobbit (hbt)*, у которого образование корневой меристемы аномально (Blilou et al., 2002). Начиная со стадии квадранта, развитие клеток гипофизиса зародышей *hbt* идет аномально (Willemsen et al., 1998). На сердечковидной стадии клетки, примыкающие к гипофизарной клетке, развиваются аномально, благодаря чему нарушается формирование латерального корневого чехлика. Однако, в отличие от *rpn1a*, мутанты *hbt* завершают эмбриогенез, но при этом проростки *hbt* лишены покоящегося центра и клеток колумеллы корневого чехлика, клеток, которые образуются из гипофиза. Ген *HBT* кодирует белок, гомологичный субъединице CDC27 комплекса, стимулирующего анафазу (APC от англ. Anaphase Promoting Complex). У мутантов *hbt* накапливается репрессор AXR3/IAA17, что сопровождается снижением экспрессии репортерного гена ауксина *DR5-GUS* (Blilou et al., 2002). Таким образом, *HBT* может осуществлять связь деления клеток с их дифференциацией, регулируя реакцию делящихся клеток в меристеме корня на ауксин.

Основываясь на том факте, что *rpn1a*, как и *bdl*, *mp* и *hbt*, влияют на развитие гипофизарной клетки, можно предположить, что у растений с нарушенной функцией протеасомы 26S нарушается передача сигналов ауксина, вызывая аномальное развитие и остановку зародыша на глобулярной стадии. Однако протеасома 26S участвует и во многих других клеточных процессах, которые могут вызывать гибель зародышей. Например, у почкующихся дрожжей RPN1 участвует в деградации 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (Hampton et al., 1996). У растений этот фермент регулирует сложные пути биосинтеза, производя множество важных молекул, включая стиролы. Роль стиролов в эмбриогенезе растений была известна и ранее, также было обнаружено, что дефекты биосинтеза стиролов влияют на развитие зародыша уже на глобулярной стадии (Schrick et al., 2000).

4.2.2 Нарушение убиквитинирования белка, но не функции RPN1, вызывает аномалии гаметогенеза

Основные функции протеасомы 26S, заключающиеся в контроле клеточного цикла, были продемонстрированы на дрожжах и на животных (Reed, 2003), особенно при фазовых переходах G1/S и G2/M. Сходные функции могут существовать и у растений, по крайней мере циклины D-типа и митотические циклины, по-видимому, расщепляются протеасомой 26S (Criqui and Genschik, 2002; Planchais et al., 2004). Контроль клеточного цикла в основном осуществляется на уровне двух лигаз E3, комплексов SCF и APC/C (Reed, 2003). Мутанты арабидопсиса с потерей функции компонентов APC/C останавливают свое развитие во время женского гаметогенеза (Carron et al., 2003; Kwee, Sundaresan, 2003), тогда как нокаут гена *CUL1*, который является компонентом комплекса SCF, останавливает эмбриогенез на стадии зиготы (Shen et al., 2002). В соответствии с этими выводами мы обнаружили, что гомозиготный мутант *rpn1a* накапливает в высокой концентрации слитый белок циклин B1;1-GUS у зародышей, остановивших свое развитие. Ранее сообщалось, что избыточное накопление

циклинов В1-типа в клетках растений вызывает дефекты клеточного цикла благодаря мутации, влияющей на сигнал его деградации (Weingartner et al., 2004). Примечательно, что у мутантов *rpn1a* также могут быть стабилизированы многие другие регуляторные белки клеточного цикла, чем можно объяснить изменения в ходе клеточного цикла.

Как упоминалось выше, ранее было показано, что различные мутации в генах, кодирующих убиквитиновые E3 лигазы, демонстрировали у соответствующих мутантов нарушения гаметогенеза и/или первого деления зиготы (Shen et al., 2002; Capron et al., 2003; Kwee, Sundaresan, 2003; Zhao и др., 2003). Представляется маловероятным, что эти этапы жизненного цикла растений действительно требуют убиквитинирования без деградации. Поэтому удивительно, что двойной мутант *rpn1a rpn1b* не проявлял более раннего фенотипа во время гаметогенеза или первых делений при развитии зародыша. Мы предположили, что протеасома 26S, по крайней мере частично, все еще функциональна при гаметогенезе и на очень ранних стадиях эмбриогенеза и что истощение ее активности приводит к остановке развития зародыша только на глобулярной стадии. Избыточное накопление циклина В1 свидетельствует в пользу наличия протеолитического дефекта у мутанта *rpn1a* на этой стадии. Либо развитие гаметофитов может включать другие протеолитические системы, которые могут компенсировать потерю функции протеасом, как это было описано у человека (Glas et al., 1998).

4.2.3 Гены RPN1a и RPN1b функционально эквивалентны, но во время репродуктивного развития их действие не является избыточным

В то время как мутации в *RPN1a* вызывают гибель зародышей на глобулярной стадии, *RPN1b*, по-видимому, не играет существенной роли на любой стадии развития зародыша. Безусловно, ранняя эмбриональная летальность гомозигот по гену *rpn1a* не означает, что изоформы RPN1 функционируют исключительно на этой стадии развития, однако нельзя исключить

функциональное перекрывание двух изоформ на более поздних стадиях. Вероятно, они регулируют деградацию белков и на других стадиях, которые, однако, не могут быть проанализированы из-за ранней эмбриональной летальности мутантов *rpn1a*.

Поскольку анализ зародышей у двойных мутантов *rpn1a/RPN1a rpn1b/rpn1b* не выявил более серьезного эффекта по сравнению с одиночными мутантами *rpn1a*, функциональную комплементацию паралогичным геном *RPN1b* можно исключить для этой фазы жизненного цикла. Однако комплементация мутанта *rpn1a-1* как геном *RPN1a*, так и геном *RPN1b* под контролем промотора *pRPN1a* показывает, что две изоформы функционально эквивалентны, если экспрессируются идентично.

Хотя *RPN1a* и *RPN1b* обнаруживают значительную, если не сказать сильную, консервативность на уровне аминокислот, и оба гена демонстрируют сходный паттерн экспрессии при развитии семян, ген *RPN1b* явно не способен заменить потерю функции *RPN1a* во время эмбриогенеза. Последнее может быть связано с различиями в паттерне или уровне экспрессии паралогов. Хотя тонкие различия в их клеточной экспрессии или регуляции клеточного цикла могут быть причиной отсутствия избыточности, самым простым объяснением является низкий уровень экспрессии *RPN1b* по сравнению с *RPN1a*, уровень экспрессии которого в три-пять раз выше во всех исследованных тканях. Вполне вероятно, что *in planta* *RPN1a*, а не *RPN1b*, взаимодействует со специфическими субстратами, которые необходимы во время эмбриогенеза, хотя *RPN1b* может выполнять эту функцию, если экспрессируется под контролем промотора *pRPN1a* (Brukhin et al., 2005b). Тонкие различия в уровне экспрессии или времени могут также быть важными параметрами для сборки специфических изоформ протеасомы 26S. Существование различных изоформ протеасомы 26S у растений предполагалось ранее (Yang et al., 2004). Описанные нами мутанты *rpn1* у арабидопсиса могут служить отправной точкой для дальнейших исследований изоформ протеасомы 26S, роли регуляторных частиц (RP) в метаболическом пути убиквитин-протеасомы 26S и их функции в развитии растений (Brukhin et al., 2005b).

При том, что протеасома 26S и ее субъединицы играют существенную роль для распознавания специфических субстратов во время репродукции и развития растений, неопределимое значение имеют убиквитиновые лигазы E3, метаболизм которых «выносит приговор» какие из регуляторных молекул клетки должны быть помечены убиквитиновыми остатками для последующего уничтожения.

4.3. Значение и функция куллинов для убиквитинов - 26S протеасомного пути. Гены *CUL3A* и *CUL3B* арабидопсиса необходимы для нормального эмбриогенеза.

Куллин (CUL)-зависимые убиквитинолигазы образуют класс структурно родственных мультисубъединичных ферментов, которые контролируют быструю и избирательную деградацию важных регуляторных белков, участвующих, среди прочего, в прогрессии и развитии клеточного цикла. К этому классу ферментов принадлежат лигазы CUL3-ВТВ, несмотря на недавние открытия их молекулярного состава, знания об их функциях и субстратах остаются все еще очень ограниченными. В отличие от почкующихся и делящихся дрожжей, *CUL3* является важным геном у многоклеточных животных. Модельное растение *Arabidopsis thaliana* кодирует два родственных гена *CUL3*, названных *CUL3A* и *CUL3B*.

На сегодняшний день известно несколько классов лигаз E3 (Jackson et al., 2000). Основным типом этих лигаз являются комплексы SCF (Skp, Cullin, F-box containing complexes) (Deshaies, 1999), которые у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* состоят из четырех первичных субъединиц: CDC53 (*cullin1*), RBX1, SKP1 и белка F-box. Белки F-box содержат вырожденный белковый домен примерно из 50–60 аминокислотных остатков, впервые идентифицированный в N-концевой области циклина F (Bai et al., 1996), и, кроме того, имеют домены белок-белкового взаимодействия, которые придают субстратную специфичность для убиквителирования. Таким образом, белки F-box являются адапторными субъединицами, которые специфически рекрутируют субстраты в основной

комплекс убиквитинирования посредством физического взаимодействия между доменом F-box и субъединицей SKP1.

Помимо CUL1, геномы эукариот кодируют дополнительные куллины (CUL2, CUL3, CUL4 и CUL5) (Gieffers et al., 2000), которые, как полагают, образуют белковые комплексы с убиквитин-лигазной активностью. В литературе существуют сообщения о молекулярном составе и функции E3-лигаз на основе CUL3 (обзор Pintard et al., 2004). В частности, было обнаружено, что некоторые доменные белки «Bric a brac, Tramtrack, and Broad Complex/Poxvirus and Zinc finger» (BTV/POZ) функционируют как субстрат-специфические адаптеры у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* и почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* (Furukawa et al., 2003; Geyer et al., 2003; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). Эти белки, содержащие домен BTV, связывают CUL3 через домен BTV и направляют субстратную специфичность через независимый домен межбелкового взаимодействия. На сегодняшний день наиболее документально подтвержденным субстратом для лигаз CUL3-BTV является белок MEI-1 нематоды, являющийся регулятором мейотической прогрессии (Furukawa et al., 2003; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). В предлагаемой модели белок MEL-26 связывается с CUL3 через его BTV-домен и рекрутирует субстрат MEI-1 через домен взаимодействия белок-белок MATH, тем самым способствуя его убиквитинированию. Это подтверждается тем, что нокдаун MEL-26 или CUL3 с помощью РНК-интерференции у эмбрионов нематод приводит к накоплению MEI1 и, как следствие, к неспособности образовать митотическое веретено. У *Drosophila melanogaster* CUL3 может быть вовлечен в деградацию Cubitus interruptus (Ci) в задних клетках глазного диска (Ou et al., 2002). Более того, нарушение функции CUL3 оказывает множественные эффекты на процессы развития у дрозофилы (Mistry et al., 2004). У млекопитающих функция CUL3 также является существенной, поскольку ее потеря у мышей вызывает остановку развития при раннем эмбриогенезе (Singer et al., 1999). У человека нарушение функции лигазы E3 на основе CUL3 может вызывать увеличение эндогенной антиоксидантной способности мозга и окислительный стресс, благодаря неспособности разрушать

транскрипционный фактор Nrf2, и тем самым вызывать нейровоспаление при болезни Альцгеймера (Sharma et al., 2020). В отличие от многоклеточных, функция ортологов CUL3 не является существенной для почкующихся и делящихся дрожжей (Geyer et al., 2003; Michel et al., 2003).

Геном модельного растения *Arabidopsis thaliana* содержит два родственных гена CUL3, называемых CUL3A и CUL3B, тогда как у грибов и многоклеточных животных присутствуют единичные гены CUL3. Белки CUL3A и CUL3B арабидопсиса способны взаимодействовать с «пальцевым» белком RING-H2 RBX1 и с несколькими представителями белков растений, содержащих ВТВ домены (Dieterle et al., 2005; Weber et al., 2005), предполагается, что они образуют сходные E3 комплексы на основе CUL3. Однако мутанты CUL3A с потерей функции жизнеспособны и фертильны и демонстрируют только умеренный фенотип; мутант *cul3a* зацветает немного позже, чем контрольные растения, и проявляет пониженную чувствительность к дальнему красному свету (Dieterle et al., 2005). Жизнеспособность мутантных растений *cul3a* может быть связана с функциональной избыточностью между двумя генами CUL3 у арабидопсиса. Мы исследовали последствия для развития растений комбинированной потери функции CUL3A и CUL3B у арабидопсиса. Генетические данные показывают, что комбинированное нарушение обоих генов снижает передачу через гаметофиты и вызывает гибель зародышей. Остановка эмбриогенеза происходит преимущественно на сердечковидной стадии и влияет как на формирование паттерна зародыша, так и на нормальное развитие эндосперма (Thomann et al., 2005).

4.3.1 У мутанта с потерей функции *cul3b* не наблюдается морфологических дефектов

В геноме арабидопсиса было обнаружено пять экспрессирующихся генов, связанных с куллином, CUL1, CUL2, CUL3A, CUL3B и CUL4 (Risseuw et al., 2003). Нами обнаружено, что белки CUL3A (At1g26830) и CUL3B (At1g69670) были на

88% идентичны на уровне аминокислотной последовательности, они относятся к той же филогенетической кладе, что и CUL3 у делящихся дрожжей, нематод, дрозофил и человека. Выравнивание последовательностей белков CUL3 (рис. 27) указывает на высокую степень консервативности, которая не ограничивается С-концевой частью белков, где расположен так называемый куллиновый домен, но и N-концевая область, которая взаимодействует с белками, содержащими ВТВ домен, также высоко консервативна. Белки арабидопсиса, CUL3A и CUL3B, более тесно связаны друг с другом, чем с другими куллинами. Такая высокая степень идентичности предполагает, что оба белка выполняют сходные, если не идентичные функции (Thomann et al., 2005).

Ранее было показано, что функция *CUL3A* не является существенным для *Arabidopsis* (Dieterle et al., 2005). Чтобы лучше понять функцию генов *CUL3* в растениях, мы осуществили поиск мутантов со вставками Т-ДНК в родственном гене *CUL3B* в различных коллекциях мутантов. Мутант *cul3b-1* был идентифицирован в коллекции GABI, у него Т-ДНК прерывает кодирующую последовательность в первом экзоне на 110 п.н. ниже стартового кодона АТГ (рис. 28а), таким образом, как ожидалось, у этого мутанта ген *CUL3B* нефункционален. В *cul3b-1* не было обнаружено *CUL3B*-процессированной мРНК (рис. 28b), что позволяет предположить, что это нулевой мутант. Гомозиготные мутантные растения *cul3b-1* были проанализированы при разных условиях роста и развития. Данные растения развивались нормально (рис. 28с) и были полностью фертильны. Морфологических дефектов при вегетативном развитии и формировании цветков не наблюдалось (не показано).

AtCUL3A	-----MSNQKRNFOIEAFKRVVVDPKYADKTWQILERAHQIYNDASGLSFEELYRNAYNVLHKFGEKLYTGTATMTSHLKEK	83
AtCUL3B	-----MSNQKRNFOIEAFKRVVVDPKYADKTWQILERAHQIYNNASGLSFEELYRNAYNVLHKYGDKLYTGTATMTSHLKEI	83
HsCUL3	MSNLSKGTGSRGTKMRIRAPP--TMDKRYVNSIDLLIKNAIQEQRKNNNSGLSFEELYRNAYTVLHKHGEKLYTGLREVTEHLINK	88
MmCUL3	MSNLSKGTGSRGTKMRIRAPP--TMDKRYVNSIDLLIKNAIQEQRKNNNSGLSFEELYRNAYTVLHKHGEKLYTGLREVTEHLINK	88
DmCUL3	MM--LRGNFPKTEGKMRIRAPP--ASMDKRYVETIASIKNAIQEQRKNNNSGLSFEELYRNAYNVLHKHNRLLYGLREVYSEHLEHK	86
CeCUL3	-----MSGRSGGGQKMRIRAPP--ATIDKQYVTQTEELIKRAIQEQRKNNNSGLSFEELYRNAYTVLHKHGERLNLGLKQDDHMASV	85
pcu3	-----MQRSAKLRIRAPP--KFSANQVDFATHIEVLCRAIGDFQKSTQSLSFEELYRNAYTVLHKYGEKLYNHVQVDVRSRKEE	80
ScCUL3	-----MITNRKIKISVPEK--LGLSESEFESWETVKYADHTYSDDMADLSFEQYKTYTYITVNLNKQPIILNRLKDYIQRKALL	80
AtCUL3A	S-KLLEBAQGG-----SFLLELNKKWNEHNKALEMIRDILMYMDRTYVIST-KKTHVHVMGLNLWRD	143
AtCUL3B	C-KSLEBAQGG-----AFLELNLRKWNHDKALOMIRDILMYMDRTYVIST-KKTHVHVMGLNLWRD	143
HsCUL3	VREDVLSNLNN-----NFIQTLNCAWNDHCTANVMIRDILMYMDRVVYQON-NVENYNLGLLIFRD	149
MmCUL3	VREDVLSNLNN-----NFIQTLNCAWNDHCTANVMIRDILMYMDRVVYQON-NVENYNLGLLIFRD	149
DmCUL3	VRADVLELHLS-----NFIPLKNCAWTDHCTSVMIRDILMYMDRVVYQOR-EVDNYNLGLLIFRD	147
CeCUL3	RRIRLFSMSS-----SFLLEVAESADHTVANVMIRDILMYMDRYVAQNHHVLPVYNLQDDHAYT	147
pcu3	TVPALYKNYDASLLGNALDIRKNDYSYTSWSRSLEAAHFFSSVNSKQHLVSVQMLSSVLYKYLKYSKSA-DKVPNENGYIFRE	169
ScCUL3	RETIYKDNTHD-----YEFITGVARLQEVQCHCFKLTGDLMMYMDVYVCKPN-RCMEVYDCLDIFRI	142
AtCUL3A	NVVH-FTKHTRLLNLTLLDLVQKERTICEVIDRGLMRNVIKMFMDLQ-----ESVYQEDFEKPFLDASSEFYKVESQEFIE-SCDCGDYLK	226
AtCUL3B	NVVY-SSKIQTRLLNLTLLDLVQKERTICEVIDRGLMRNVIKMFMDLQ-----ESVYQDDFEKPFLEASAEFYKVESQEFIE-SCDCGEYLK	226
HsCUL3	QVVR-YGCRRGSSTANSIGYDCAEARRSRSGATRACQYLLILLEG--RQVVEEDFEAPFLMSAEFFQMESQKFFA-ENSASVYIK	235
MmCUL3	QVVR-YGCRRDHROTLLDMTAERKKEVVDRGATRACQYLLILLEG--RQVVEEDFEAPFLMSAEFFQMESQKFFA-ENSASVYIK	235
DmCUL3	QVVR-YSEOKAIREKLLGAVMEERHSEANHLAKNACSLITLGLINS--RQVVEEDFEKPFLEASAEFYKVESQKFFA-ENNAVYIK	233
CeCUL3	ETLR-QNGGDRRDRDALLEKLDKRSQNIWHGKRNACDMLSLGIDS--RQVVEDEFERFLKESDYRQVDCVKNLSGDNACFYIA	234
pcu3	VVLLNSFEIGEVEETIILVYLERKCNTINPLNDCDDLNSPSENKKTETLVVLPAPKLSYARNEYLESSTVIG-VFQVVEYIK	258
ScCUL3	ETLQKSSSLISALISDIERIRNLGSVSEHTSVAWLIGMETLHNR--DSFELTDPEPVLISATBEYKNAIDIEL---TPLESIE	227
AtCUL3A	KSEKRLTEEIERVAHYLDAKSEKITSVVEKEMIANHQRLVHMENSGLVNMLNDKYEDLGRMNLFRVIV-----GLVTVRDVMIT	309
AtCUL3B	KAEKPIVEEIERVVYLDKASEKITSVVEREMIANHQRLVHMENSGLVNMLNDKYEDMGRMNLFRVIV-----GLVTVRDVMIT	309
HsCUL3	KVEARNEEIERVMHCLDKSTEPEPVKVVVERELISKHAKTIVEMENSGLVHMIKNGKTEDLGCMMKESRVPN-----GKVTMCESMS	318
MmCUL3	KVEARNEEIERVMHCLDKSTEPEPVKVVVERELISKHAKTIVEMENSGLVHMIKNGKTEDLGCMMKESRVPN-----GKVTMCESMS	318
DmCUL3	KVEARTEESSAALVLDKDEPRVVRVVEELIKKHRIPIVEMENSGVVYMIKSKTEDIACPKESRVEE-----GKVIADTMS	317
CeCUL3	QVEIAHDEASASRLLDKMTEAKLQVMDVVVVEHICITIVYQGGVFMDEHKKIEDLTRIRIFKRGDSVTVPGGGLKALKAVS	324
pcu3	KAEKRFEBEKSRKNIPLFKIASPLSVVEDELLSKHDDLEENQSTCFSSMIDSSNPEGLQVVESESRLV-----GKSLKYLIA	341
ScCUL3	KIRLRQFESMLDSSFLNVDSEHKIKVLENVLLGKLSDIIEDLTHEAVVNSNG--KLLQETVDSSEEKY-----VTVTESK	306
AtCUL3A	SHLREM-----GKQVLTDPKES--KDPVEFVQRLDLDKDYDKIINTAEG-----NDKTFQNALNSSFEYFINLNRSP--	376
AtCUL3B	LHLREM-----GKQVLTDPKES--KDPVEFVQRLDLDKDYDKIRINMABN-----NDKTFQNALNSSFEYFINLNRSP--	376
HsCUL3	SYLREQ-----GKALVSEEGEG--KNPVDYIQGLLDLKSRRDFILESAN-----NDRLKQKTAGDFEYFLNLNRSP--	385
MmCUL3	CYLREQ-----GKALVSEEGEG--KNPVDYIQGLLDLKSRRDFILESAN-----NDRLKQKTAGDFEYFLNLNRSP--	385
DmCUL3	AYLREQ-----GEMLVKEENGNNTNPTFVGNLLLDKDFRQFVHSA-----NDRLKQVISDFFHFLNLNRKSP--	385
CeCUL3	EYLNQT-----GSNIVKNEDLL--KPNVNVNELIQKDYESSLITABA-----DDEKQRFIDDFEFLNSRQSP--	391
pcu3	KYVAHHGKLINETTSQALEGRMAVGRLSSNATMATVQKVALWQRLNTITSTMD-----ADRSILASLSDAVTEVDGYRRA	422
ScCUL3	SYLNKN-----AINIPFNEGNRKQGNALITVSEIIVLYRSQHSFESIDFGSVRLNLTGDVSNALIDGVFMSVSKEGALS	385
AtCUL3A	EFISLFDVDDKLRKGL-KGITDQVDEVILDKVMMFLFRYLOEKDVFEEKYKQHLAKRLLSGKTVSDDAERSLIVKLTKECGYQFTSKLEGMF	465
AtCUL3B	EFISLFDVDDKLRKGL-KGVGEPDVLDLIDKVMMLFRYLOEKDVFEEKYKQHLAKRLLSGKTVSDDAERNLIVKLTKECGYQFTSKLEGMF	465
HsCUL3	EYLSLFDIDKLRKGV-KGLTEQEVETILDKA-MVLFRFMQEKDVFERYKQHLARRLLLNKSVSDDBERNMISKLKTECCOFTSKLEGMF	474
MmCUL3	EYLSLFDIDKLRKGV-KGLTEQEVETILDKA-MVLFRFMQEKDVFERYKQHLARRLLLNKSVSDDBERNMISKLKTECCOFTSKLEGMF	474
DmCUL3	EYLSLFDIDKLRKGG-KGNSEQIESLIDKTMVLFRLFTEKDVFRYKTHLAKRLLLNKSVSDDBERNMISKLKTECCOFTSKLEGMF	474
CeCUL3	EVVALYMDMLRSGL-KCVSDAEMDNKLDNVMILFRYLOEKDVFEEKYKQHLAKRLLDSCSDBVEKALLAKLKECCOFTSKLENMF	480
pcu3	EYISLFDIDNLRKDA-RKALGSEIATLQNSVTLFRFISEKDVFEKRYKTHLAKRLLNRSISDSEALGMISRLIQANVPTQKLEGMF	511
ScCUL3	EYLSLFDVHCMTREKDAEIVKQDPLDSTKIGLTKEDFIEKYKSRRLQOASIV-ETERVQVMTKRVLTFTSKLEITL	474
AtCUL3A	TDMKTSHTDTRGFYG--SHPELSEG--PTLIVQVLTGWSPT---QEAVP--CNLPAEVSVLCEKFRSYLLGTHTGRRLSWQTNMGTDIKA	548
AtCUL3B	TDMKTSHTDTRGFYN--SHPELSEG--PTLIVQVLTGWSPT---QETIQ--CNLPAEVSVLCEKFRSYLLGTHTGRRLSWQTNMGTDIKA	548
HsCUL3	RDMISNTIMDEHQHLQATGVSLEGVDTVRLVLTGYNPT---SATPKCNIPAPRHAFFIFRFRYAKHSGRQTLQHHMGSADINA	561
MmCUL3	RDMISNTIMDEHQHLQATGVSLEGVDTVRLVLTGYNPT---SATPKCNIPAPRHAFFIFRFRYAKHSGRQTLQHHMGSADINA	561
DmCUL3	KDMISNTIMDEKNFVNNNLSLEGVDTVRLVLTGYNPT---CTATPNCNIPAPRHAFFIFRFRYAKHSGRQTLQHHMGSADINA	561
CeCUL3	RKELWLLIATSRDWREAQPTKMS-IDISRLVLAAGVPT---VOCNP-VVLEQELSAYMFTOYTEKHTGRKLTITLGNADIVA	565
pcu3	NDMNSQELIQEKHN-SALQSAKPALDINVSIIASTFRWID-LSHHKIKCFKVLHAQIQDTDFYLSKHTGRKLTITLGNADIVA	599
ScCUL3	RDISLSSEMYQAQHS---TINSIEYLSFAPQVLTGWSPT---IDEGISLPPRMSQLLACPEGYSLKYKERVLLKAAHHSVTEIGC	561
AtCUL3A	IFGK-----GQKHELNVSTFQMCVLMFLNNSDR-----LSYKETEQAATEIPADLKRCLQSLACVKGKNV	608
AtCUL3B	VEGK-----GQKHELNVSTFQMCVLMFLNNSDR-----LSYKETEQAATEIPTDLKRCLQSMACVKGKNV	608
HsCUL3	TYG-----PVKKEDGSEVGVGAQVTGSNTRKHILQVSTFQMTILMFLNREK---YTFEEIQEDTIPERELVALQSLACGPTQRV	643
MmCUL3	TYG-----PVKKEDGSEVGVGAQVTGSNTRKHILQVSTFQMTILMFLNREK---YTFEEIQEDTIPERELVALQSLACGPTQRV	643
DmCUL3	VEYGRKAVESEKDKDAPSSSSSGCGVP--TTRKHILQVSTYQMCVLLFNRRV---LYDDIHEDTIPERELVALQSLSMGPAQRV	647
CeCUL3	TYPPPKASMSNEENGPGPSSSGESMKERKPEKHLQVNTNOMIILLQPNHNR---ISCQQLMDELKIPERELKFNQSLALGASQRT	652
pcu3	NPK-----RYDQNVSTIASVILLPQDLKENQCIIEEILEKANIEVGLKRNQSLACAK--YKI	660
ScCUL3	QNS-----GYEISFSVYAGVIFLLLEDYE---LILGELYELTHIFIDVRSVLMVSMSTIP-RCKI	620
AtCUL3A	IKK--EPMSKD--ICEEDLVVNDKFTSKFYKVKIGTVAQ--KETEPEKQETQRQVE---EDRKPQIEAAIVRIMKSRKILDHNNIIAEVT	691
AtCUL3B	LKK--EPMSKE--IAEEDLVVNDKFTSKFYKVKIGTVAQ--KETEPEKQETQRQVE---EDRKPQIEAAIVRIMKSRRLVDHNNIIAEVT	691
HsCUL3	LRK--EPKSKE--IENGHIETVNDQTSRKLHRVKIQVAAKQCSDPERKSTRQKVD---DDRHELEAAIVRIMKSRKQHNLVAEVT	727
MmCUL3	LK--EPKSKE--IESGHIETVNDQTSRKLHRVKIQVAAKQCSDPERKSTRQKVD---DDRHELEAAIVRIMKSRKQHNLVAEVT	727
DmCUL3	LVRNSKTKKD--IEPTDEHYVNDANSKHRVKIQVAAKGSEPERKSTRQKVD---DDRHELEAAIVRIMKSRKRLAHLNLLVSDVT	732
CeCUL3	LV--KNKGDADMSDEAVNNDQSRKLRVVKQVAGK-VESEPEIRETRQKVE---DDRHELEAAIVRIMKSRKQHNLVAEVT	736
pcu3	LK--DEKRE--VNAGDKYFNENVSNLARKISVAGTRVEDDSEKRLQKVD---ESRKHQADCLVVRVMQKCEHNLQAEVT	744
ScCUL3	LKK--SSSGN-----MKSVNYFESSPNRKKVQPVACPLPSQKSNLASSVDTYDNIVMELSAIVRIMKTEGKLSHQOLERT	703
AtCUL3A	KQLQPRFLANPTEIKKRIEGLIERDFLERDSDRKLRYLIA	732
AtCUL3B	KQLQPRFLANPTEIKKRIEGLIERDFLERDSDRKLRYLIA	732
HsCUL3	QOLKARFLPSEVVIKKRIEGLIEREYLAETPEDRKYVTVVA	768
MmCUL3	QOLKARFLPSEVVIKKRIEGLIEREYLAETPEDRKYVTVVA	768
DmCUL3	SOLKARFLPSEVVIKKRIEGLIEREYLAETPEDRKYVTVVA	773
CeCUL3	QOLRHRFLPSEIIRIETLIEREYLADEHDAVQYIA	777
pcu3	ROLNRFHSEMMIKRRIEGLIEREYLAQADNGRIEYIA	785
ScCUL3	KRTQSLSLTPEILKRSIQLLEKEYIQNADPSYHYIA	744

Рисунок 27 - Сравнение аминокислотных последовательностей белков CUL3A и CUL3B у *Arabidopsis* и белков CUL3 у других организмов.

Последовательности белка CUL3 выравняли с помощью ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Идентичные и консервативные остатки в AtCUL3A и AtCUL3B заштрихованы черным цветом; эти остатки затенены серым цветом в других белках CUL3 в случае консервативности. Для выравнивания использовали следующие белки CUL3: *Schizosaccharomyces pombe* (pCu, SNP_592949); *Saccharomyces cerevisiae* (ScCUL3, AAQ91375); CUL3A (AtCUL3A, CAC87120) и CUL3B (AtCUL3B, NP_177125) *Arabidopsis thaliana*; *Mus musculus* (MmCUL3, AAN27304); *C. elegans* (CeCUL3, NP_503151); человека (HsCUL3, AAC36682); *Drosophila melanogaster* (DmCUL3; NP_723908). (Thomann et al., 2005).

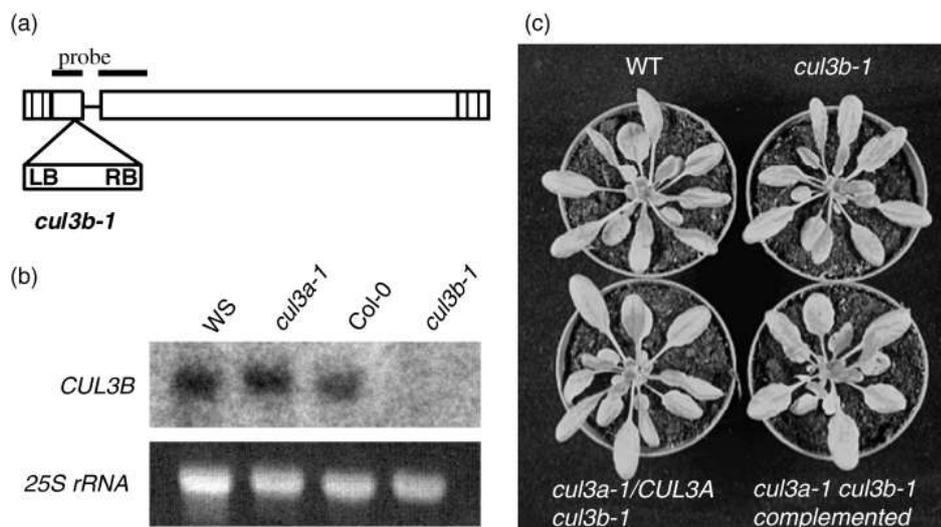


Рисунок 28 - Потеря функции *CUL3B* не влияет на развитие растения.

(a) Схематическое изображение вставок Т-ДНК в гене *CUL3B*. LB и RB указывают на ориентацию левой и правой границ Т-ДНК соответственно. Обозначены экзоны (незаштрихованные прямоугольники), интроны (одна линия) и 5' и 3' нетранслируемые области (заштрихованные прямоугольники). (b) Уровень транскрипта *CUL3B* у растений дикого типа и мутантных растений. РНК выделяли из 3-недельных растений. Расположение зонда (пробы) указано в (a). (c) Шестинедельное растение дикого типа, гомозиготное по *cul3b-1*, мутантное

растение *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* и двойной гомозиготный мутант *cul3a-1 cul3b-1*, комплементированный геномным фрагментом *CUL3A*. (Thomann et al., 2005).

Слитый с промотором *CUL3B* GUS (*CUL3B-GUS*) (Weber et al., 2005), а также РНК блоттинг (данные не показаны) демонстрировали, что *CUL3B* экспрессируется на всех анализируемых стадиях развития растений, начиная с молодых проростков и заканчивая цветущими растениями. Таким образом, на уровне тканей и органов *CUL3B* имеет сходный с *CUL3A* паттерн экспрессии (Dieterle et al., 2005), что дополнительно указывает на то, что оба кулина могут функционировать избыточно в различных тканях растений (Thomann et al., 2005).

4.3.2 В репродуктивных органах и во время эмбриогенеза CUL3a и CUL3b экспрессируются перекрывающимися паттернами

Для исследования потенциально перекрывающихся профилей экспрессии на клеточном уровне, мы определили пространственный и временной паттерн экспрессии обоих генов *CUL3* в репродуктивных органах и во время эмбриогенеза. Для этого мы проводили эксперименты по гибридизации РНК *in situ* на срезах цветочных почек и развивающихся стручков с использованием *CUL3A* антисмысловых и смысловых контрольных зондов. На ранних стадиях развития цветка транскрипты были обнаружены во всей меристеме цветка с более низкий уровень экспрессии был отмечен в чашелистиках и лепестках (рис. 29 а, б). Особенно сильные сигналы наблюдались в появляющихся примордиях. В дальнейшем достаточно сильный сигнал был обнаружен в развивающихся плодолистиках, особенно в формирующихся примордиях семязачатков (рис. 29 с, d, e), а затем в удлиняющихся интегументах и тетрадах мегаспор.

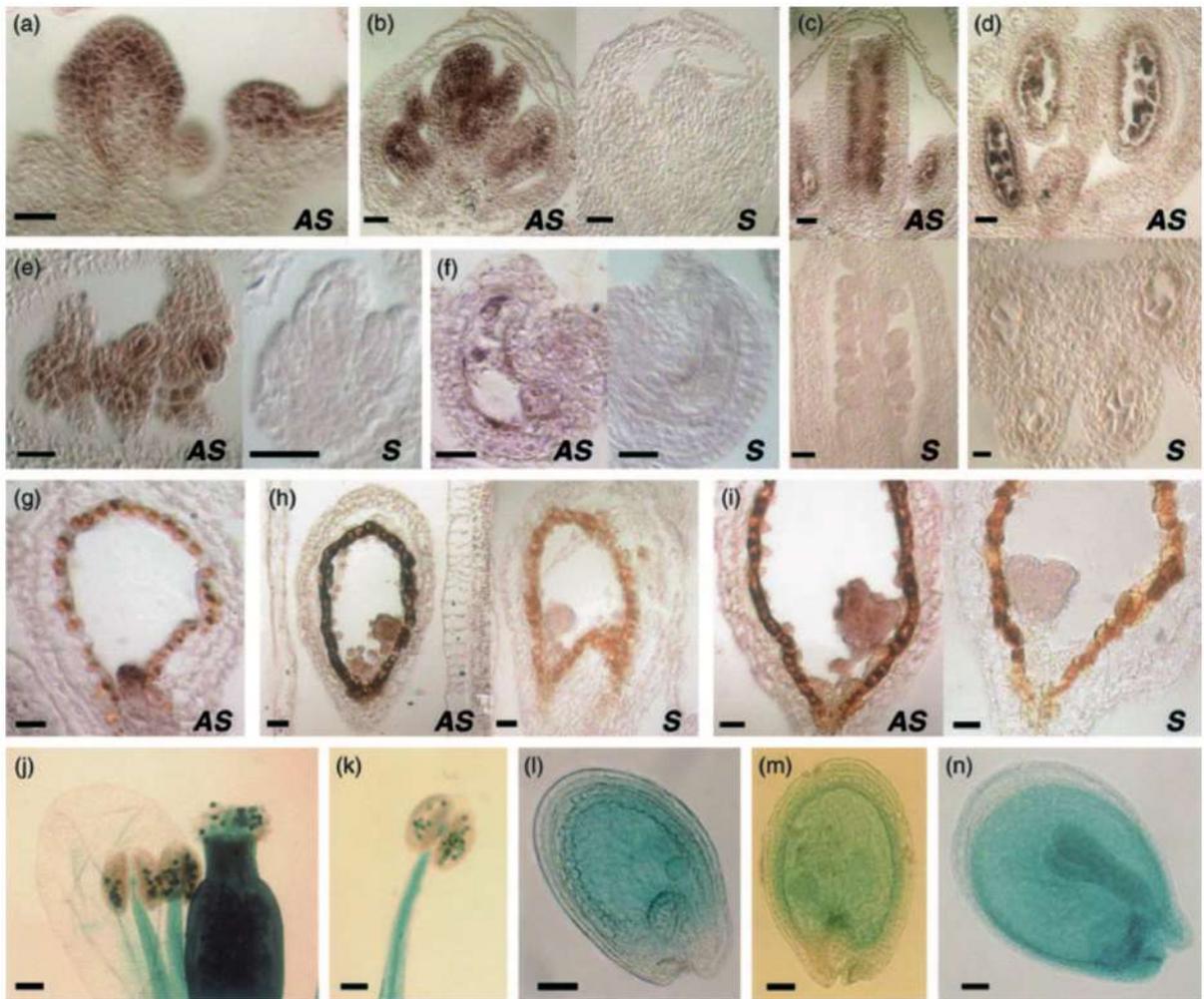


Рисунок 29 - Детекция экспрессии гена *CUL3* в развивающихся цветках и семенах с помощью гибридизации *in situ* и исследований экспрессии конструкторов *CUL3A*-промотор::*GUS* и *CUL3B*-промотор::*GUS*. (a) Продольный срез цветочной меристемы. (b) Бутон цветка. (c) Цветочная почка с формирующимися семязачатками. (d) Материнские клетки пыльцы (PMC). (e) Примордии семязачатков. (f) Зрелый зародышевый мешок. (g) Экспрессия *CUL3A* в халазальной зоне эндосперма. (h) Зародыш на глобулярной стадии. (i) Зародыш на сердцевидной стадии. (j) Линия *GUS*, слитый с промотором *CUL3A*, показывающая экспрессию *GUS* в соцветии. (k) Линия *GUS*, слитый с промотором *CUL3B*, демонстрирующая сильную экспрессию *GUS* в пыльцевых зернах. (l) Линия *GUS*, слитый с промотором *CUL3B*, показывающая экспрессию *GUS* в семенах на глобулярной стадии. (m) Линия *GUS*, слитый с промотором *CUL3A*, показывающая экспрессию *GUS* в семенах на сердцевидной стадии. (n) Линия

GUS, слитый с промотором *CUL3B*, демонстрирующая экспрессию *GUS* в семенах на стадии торпеды. Гибридизация мРНК *in situ* выглядит как темное окрашивание. AS, антисмысловой зонд; S, смысловой зонд. Масштабная линейка = 20 μm (a–i), 100 μm (j, k) и 50 μm (l–n). Thomann et al., 2005.

В зрелых семязачатках транскрипты были обнаружены в клетках зародышевого мешка и, на гораздо более низком уровне, в спорофитной ткани семязачатка (рис. 29 f). В тычинках высокий уровень транскриптов *CUL3A* обнаруживался в спорогенных клетках (рис. 29 d) и в меньшей степени в тетрадах микроспор. Более слабый сигнал был обнаружен в тапетальной ткани пыльника (Thomann et al., 2005).

После оплодотворения экспрессия *CUL3A* наблюдалась в зародыше и эндосперме (рис. 29 h, i), причем особенно сильный гибридизационный сигнал обнаруживался в халазальной части эндосперма (рис. 29 g). Интенсивность сигнала была высокой на глобулярной (рис. 29 h) и сердечковидной стадиях (рис. 29 i) эмбриогенеза. Гибридизационный сигнал в спорофитных тканях семязачатка постепенно уменьшался по мере его развития и не наблюдался в семенной оболочке (рис. 29 g-i). В плодолистиках сигнал не был обнаружен ни в перегородке, ни в тканях створки (данные не показаны).

Поскольку антисмысловой зонд *CUL3A* может также обнаруживать и транскрипты *CUL3B*, для более точного выяснения паттернов экспрессии обоих генов при эмбриогенезе мы исследовали трансгенные линии, несущие в геноме конструкции слияния *CUL3A*-промотор- или *CUL3B*-промотор-*GUS* (Dieterle et al., 2005; Weber et al. др., 2005). Слитые трансгены *CUL3A*- промотор- и *CUL3B*-промотор-*GUS* демонстрировали идентичные паттерны экспрессии *GUS* в зрелой пыльце (рис. 29 j, k) и на разных стадиях развития семян (показано только для одной конструкции на каждой стадии развития) (рис. 29 l–n). Данный анализ экспрессии показывает, что гены *CUL3A* и *CUL3B* экспрессируются в значительной степени перекрывающимися паттернами при репродуктивном развитии, указывая

на то, что они могут иметь избыточные функции в этих тканях (Thomann et al., 2005).

4.3.3 Нарушение генов *CUL3a* и *CUL3b* снижает гаметофитную передачу и вызывает материнский эффект гибели зародышей

Для доказательства того, что гены *CUL3A* и *CUL3B* действительно функционально избыточны и для получения двойных мутантов мы использовали пыльцу мутанта *cul3b-1* для опыления гомозиготного мутанта *cul3a-1*. Из потомства растений F₂, полученного в результате этого скрещивания были идентифицированы несколько комбинаций мутаций, а именно, *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1/cul3b-1* (обозначенные нами как *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1*), а также *cul3a-1/cul3a-1 CUL3B/cul3b-1* (обозначенные как *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1*). При генотипировании 96 растений, не было идентифицировано ни одного дважды гомозиготного мутанта *cul3a-1 cul3b-1*. Поскольку мутанты *cul3a-1* и *cul3b-1* содержали вставку Т-ДНК с интегральными маркерами селекции (гены устойчивости к канамицину + BASTA и сульфадиазину соответственно), мы использовали маркер устойчивости к канамицину для дальнейших генетических характеристик и анализа сегрегации (Brukhin et al., 2000; Thomann et al., 2005). Таким образом, растения *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* были подвергнуты самоопылению, а потомство F₃ было повторно генотипировано для возможного выявления гомозиготных *cul3a-1 cul3b-1* мутантных растений (в потомстве F₃ ожидалось 25% таких растений в случае несцепленных генов). Анализ более 50 растений, не выявил ни одного растения с двойной мутацией, что позволяет предположить, что функция *CUL3* важна для жизнеспособности арабидопсиса.

Сегрегационный анализ потомства самоопыленных гетерозиготных растений *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* показал, что соотношение канамицин устойчивых к канамицин чувствительным проросткам было 1,4:1, а не 2:1, как ожидалось в случае зиготической эмбриолетальной мутации (таблица 9). Аналогично этому потомство самоопыленных растений *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1* показало, что

устойчивые к сульфадиазину проростки расщеплялись в соотношении 1,3:1 (таблица 9). Эти наблюдения предполагают снижение гаметофитной передачи. Чтобы определить, в какой степени снижается передача мутационной инсерции через мужской и женский гаметофиты, были проведены реципрокные скрещивания растений дикого типа с мутантными растениями *cul3a-1/CUL3A cul3b-1*.

Таблица 9 - Генетический анализ мутантных растений *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1* и *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1*.

Скрещивание	Kan ^R or Sulf ^R	Kan ^S or Sulf ^S	Растений в целом	значение <i>P</i>	TE _F	TE _M
<i>CUL3A/cul3a-1 cul3b-1</i> самоопыление	8633	6185	14818	<0.0001	NA	NA
<i>cul3a-1 CUL3B/cul3b-1</i> самоопыление	1241	930	2171	<0.0001	NA	NA
<i>CUL3A/cul3a-1 cul3b-1</i> × дикий тип (wt)	414	519	933	0.0006	79.8%	NA
дикий тип (wt) × <i>CUL3A/cul3a-1 cul3b-1</i>	226	797	1023	<0.0001	NA	28.3%

Ген *NPTII*, придающий устойчивость к канамицину (Kan^R, проростки, устойчивые к канамицину; Kan^S, проростки, чувствительные к канамицину), использовали в качестве маркера селекции растений *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1*, тогда как устойчивость к сульфадиазину (Sulf^R, проростки, устойчивые к сульфадиазину; Sulf^S, чувствительные к сульфадиазину проростки) использовали для растений *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1*. Эффективность передачи была рассчитана в соответствии с Howden et al. (1998): TE = KanR/KanS × 100%; *P*-значение, основанное на коэффициенте сегрегации 1:2, ожидаемом для зиготической эмбриолетальной мутации, и 1:1 для реципрокных скрещиваний, ожидаемом для нормальной передачи; TE_F, женская эффективность передачи; TE_M, эффективность мужской передачи; N/A, не применимо. При значении *P* < 0,05 нулевая гипотеза отвергается. Из Thomann et al., 2005.

Эффективность передачи (TE) маркера устойчивости к канамицину была снижена как через мужские, так и через женские гаметофиты. Однако снижение TE было намного сильнее через мужской гаметофит (пыльцу) (таблица 9).

Таблица 10 - Анализ фертильности зрелых стручков.

Комбинации аллелей	Нормальных семян	Абортированных семян	Семян в целом	значение <i>P</i>
<i>CUL3A/cul3a-1 cul3b-1</i>	1734	405 (18.9%)	2139	0.0011
<i>cul3a-1 CUL3B/cul3b-1</i>	868	188 (17.8%)	1056	0.0001

Зрелые стручки мутантных растений анализировали на наличие недоразвитых семян. *P*-значение, основанное на соотношении 1:3, как и ожидалось для летальности зиготических зародышей. При значении *P* < 0,05 нулевая гипотеза отвергается.

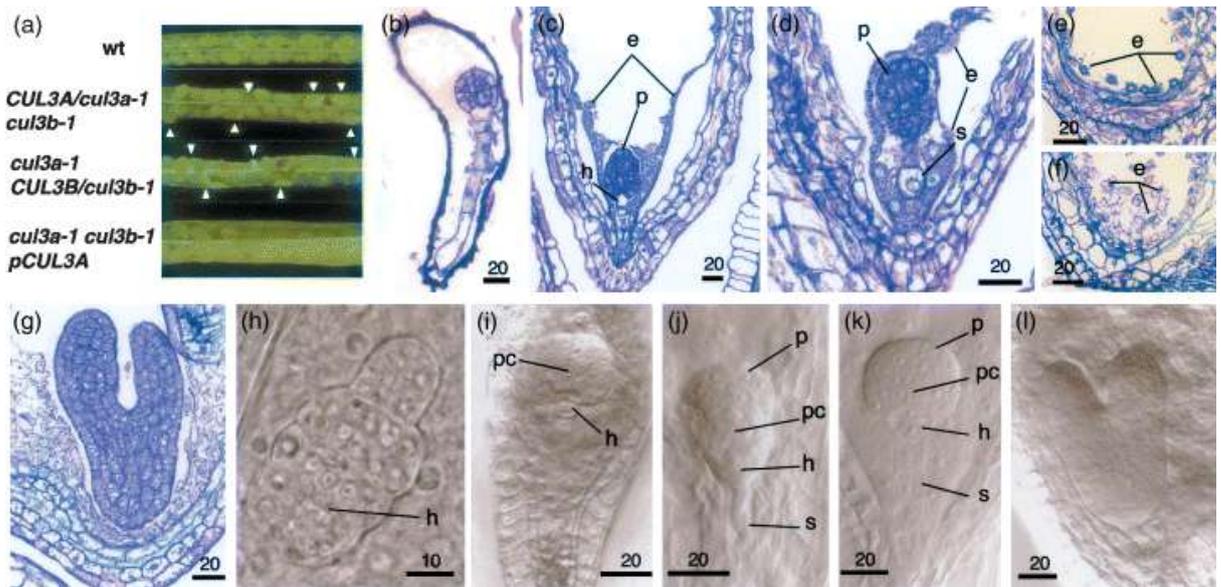


Рисунок 30 - Развитие семян и зародышей у растений с двойной мутацией *cul3*. (Thomann et al., 2005).

(a) Фенотип стручков растений дикого типа и мутантных растений. Стрелки указывают на недоразвитые семена. (b–g) Срезы, окрашенные толуидиновым синим. (b) Остановившийся в развитии зародыш на ранней глобулярной стадии, в семени отсутствует эндосперм. (c, d) абортированные семена с зародышами на глобулярной стадии с дефектами формирования протодермы, прокамбия, суспензора и производных клеток гипофиза. (e) Дефектный ценоцитный эндосперм в прекратившем развитие семени. (f) Нормальный клеточный эндосперм из семян дикого типа, извлеченных из того же стручка, что и (e). (g) Семена дикого типа на стадии торпеды из того же стручка, что и (b – d). (h–l) Просветленные семена. (h–j) Остановившие развитие семена, содержащие зародыш на глобулярной стадии с дефектами, как описано для (c) и (d). (k) Глобулярный зародыш дикого типа. (l) Семена дикого типа на стадии торпеды из того же стручка, что и (h–j).

e, эндосперм; h, производные гипофизарной клетки; pc, прокамбиальные клетки; p, протодерма; s, суспензор. Масштабная линейка = 20 μ m.

Затем мы исследовали зрелые стручки на наличие недоразвитых семян (рис. 30 a). Приблизительно 19 % семян абортировались после самоопыления мутантных

растений *cul3a-1/CUL3A cul3b-1*, аналогичная доля абортивных семян наблюдалась и у растений с комбинацией мутантных аллелей *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1* (таблица 10). Однако число абортированных семян не соответствовало зиготической эмбриолетальности, при которой ожидалось соотношение расщепления абортированных семян к нормальным семенам 1:3. Учитывая низкую передачу мутации *cul3a cul3b* через пыльцу, ожидается, что только около 10% зародышей будут гомозиготными $[(TEF/(1 + TEF)) \times (TEM/1 + TEM)] = (0,798/1,798) \times (0,283/1,283) = 0,098$; Moor, 2002]. С другой стороны, женская передача снижается на 20,2%, так что ожидается, что еще примерно 10% от общего числа семян остановят свое развитие, даже если аллель, унаследованная по отцовской линии, будет дикого типа. Эти наблюдения позволяют предположить, что примерно 20% летальных зародышей приходится на половину каждого из генотипов *cul3a/cul3a cul3b/cul3b* или *cul3a/CUL3A cul3b/cul3b*, причем последние получают аллель *CUL3A* дикого типа по отцовской линии.

Таким образом, сегрегационный анализ, гаметофитная передача и фенотип семян предполагают, что двойной нокаут *CUL3A* и *CUL3B* влияет на материнский контроль развития зародыша (Thomann et al., 2005).

Для изучения стадии остановки эмбриогенеза мы проанализировали просветленные семена из стручков растений *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1*, содержащие зародыши дикого типа на ранней стадии торпеды, на стадии изогнутых семядолей и на стадии зрелости (табл. 11). На ранней стадии торпеды было обнаружено значительное количество (около 15%) семян, задержавших развитие на глобулярной или даже на более ранних стадиях. Однако в стручках, содержащих семена на стадии изогнутых семядолей, большая часть отстающих в развитии семян была на сердечковидной стадии. Анализ семян на стадии зрелого зародыша, обнаружил аналогичную долю зародышей остановившихся на сердечковидной стадии. Полученные результаты показывают, что зародыши, сформированные из яйцеклеток мутанта *cul3a-1 cul3b-1*, останавливают свое развитие на множественных стадиях, причем большинство из них останавливаются на сердечковидной стадии, которая является наиболее выраженной стадией остановки

эмбриогенеза. Сходные пропорции остановивших свое развитие зародышей были обнаружены и в стручках другой комбинации мутантов (*cul3a-1 CUL3B/cul3b-1*) (табл. 11). Эти наблюдения согласуются с анализом зрелых стручков (см. табл. 10). Мы не обнаружили двух различных классов (фенотипов) абортированных зародышей, которые соответствовали бы двум описанным выше генотипам. По-видимому, определенная часть зародышей, происходящих из мутантных яйцеклеток *cul3a-1 cul3b-1*, абортируется независимо от того, была ли унаследованная по отцовской линии аллель дикого типа или мутантная. Таким образом, мутанты *cul3a cul3b* проявляют гаметофитный материнский эффект, сопровождающийся эмбриональной летальностью при пониженной пенетрантности.

Таблица 11 - Анализ просветленных семян, содержащих зародыши дикого типа на ранней стадии торпедо, на стадии изогнутых семядолей и на стадии зрелости.

Аллель	стадия развития	ранняя глобула	глобула	сердечко	торпедо	согнутые семядоли	в целом здержанные	нормальных семян	N
<i>CUL3A/cul3a-1 cul3b-1</i>	Раннее торпедо	9 (2,1)	56 (13,1)	27 (6,3)	NA	NA	92 (21,5)	336 (78,5)	428 (100)
	Согнутые семядоли	13 (4,1)		35 (11,2)	13 (4,1)	NA	61 (19,4)	252 (80,6)	313 (100)
	Зрелый зародыш	33 (3)		108 (9,7)	64 (5,7)	5 (0,5)	210 (18,9)	901 (81,1)	1111 (100)
<i>cul3a-1 CUL3B/cul3b-1</i>	Зрелый зародыш	41 (4,1)		90 (8,9)	51 (5,1)	7 (0,7)	189 (18,8)	819 (81,2)	1008 (100)

Значения в скобках указаны в процентах. NA, не применимо.

Для того чтобы еще раз убедиться, что гибель зародышей вызвана мутациями в генах *CUL3*, мы трансформировали мутантные растения *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* геном *CUL3A* дикого типа. Как уже было показано ранее, трансформированный геномный фрагмент дополняет слабый фенотип одиночного мутанта *cul3a-1* (Dieterle et al., 2005). Растения T1 селектировали на среде, содержащей антибиотик гиромоцин, а затем опрыскивали BASTA для отбора мутантных растений *cul3a-1*. Растения потомства T2 анализировали на присутствие трансгена по наличию маркера гиромоцина и мутации *cul3a-1* методом BASTA-селекции (Brukhin et al., 2000). Сорок восемь из проанализированных растений были генотипированы, 19 из них были идентифицированы как гомозиготные двойные мутанты *cul3a-1 cul3b-1*

(как показано на рисунке 28 с). Этот результат, очевидно, доказывает, что потеря функции *CUL3* вызывает летальность зародыша.

4.3.4 Потеря функции *CUL3* влияет на формирование паттерна зародыша арабидопсиса и на развитие эндосперма

Эмбриогенез у растений арабидопсиса дикого типа хорошо описан в ряде работ (Jürgens, Mayer, 1994; Полякова, 1964 и др.). Для более полной характеристики остановки развития зародышей у мутантов *cul3a-1 cul3b-1* на цитологическом уровне, мы провели наблюдения под световым микроскопом просветленных семян и гистологических срезов. В редких случаях аномалии наблюдались уже на ранней глобулярной стадии (рис. 30 b). Однако чаще остановка эмбриогенеза происходила начиная с глобулярной стадии (рис. 30 с, d, i, j), но преимущественно на сердечковидной стадии (рис. 31 a, b, d, e). Особенности задержанных в развитии зародышей были следующими: (1) преждевременное или аномальное деление гипофизарной клетки (рис. 30 с, h, i и 31 b, d). Ориентация гипофизарных клеточных стенок часто отклонялась от нормы; (2) недоразвитый короткий суспензор (рис. 30 с, j и 31 a, b, d); (3) аномалии деления прокамбиальных клеток (рис. 31 a, b, d); (4) аномалии в формировании протодермы (рис. 30 с, d, j); (5) эндосперм в большинстве остановившихся семян был недоразвит, ценоцитный (ядерный) или с замедленной целлюляризацией (рис. 30 b, c, d, e и 31 a, b, d, e).

Таким образом, дефекты, наблюдаемые у *cul3a-1 cul3b-1* мутантных зародышей, указывают на то, что *CUL3* необходим для нормального развития зародыша и эндосперма. Более того, *CUL3*, по-видимому, также ограничивает деление клеток, особенно в гипофизисе, где у мутантных зародышей наблюдались дополнительные деления и аномальные плоскости деления.

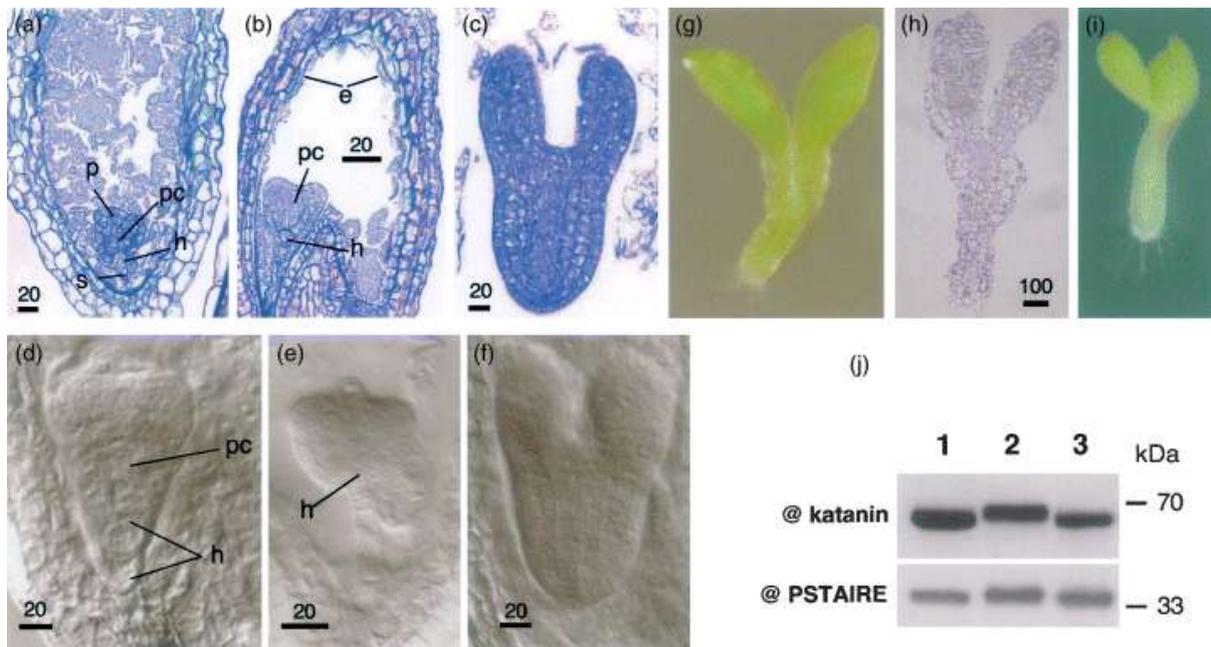


Рисунок 31 - Семена двойного мутанта *cul3*, остановившие развитие на сердечковидной стадии, и аномальные проростки *cul3a cul3b*. (Thomann et al., 2005).

(a–c) Срезы, окрашенные толуидиновым синим. (a, b) Задержанные в развитии зародыши на ранней сердечковидной стадии. (c) Нормальные зародыши на стадии торпеды из того же стручка, что и (a, b). (d – f) Просветленные семена. (d, e) Зародыши, остановившие свое развитие на ранней сердечковидной стадии. (e) Нормальные зародыши на стадии торпеды из того же стручка, что и (d, e). (g) Дефектный проросток *cul3a cul3b*, остановивший рост вскоре после прорастания. (h) Окрашенный толуидиновым синим срез дефектного проростка *cul3a cul3b*, аналогичный (g). (i) Дефектный проросток *cul3a cul3b* с тремя неразвернувшимися семядолями. (j) Иммунодетекция с антителом против катанина 20 мкг экстракта растворимых белков, разделенных с помощью 10% SDS-PAGE. Дорожка 1 – 5-дневные проростки Col-0 дикого типа; дорожка 2 – 12-дневные проростки *CUL3A/cul3a-1 cul3b-1*; дорожка 3 – 12-дневные проростки *cul3a-1 cul3b-1*. Тот же самый блот очищен от предыдущего антитела и подвергнут иммуноблотингу с поликлональным антителом против PSTAIRE, используемым в качестве контроля загрузки. e, эндосперм; h, производные гипофизарной клетки; pc, прокампбиальные клетки; p, протодерма; s, суспензор. Масштабная линейка = 20 µm.

4.3.5 Двойные мутанты *cul3a-1 cul3b-1* завершают эмбриогенез, но вскоре после прорастания проростки останавливают свой рост

Хотя большинство двойных мутантов останавливаются на сердечковидной стадии эмбриогенеза, мы исследовали, могут ли некоторые из них завершить эмбриогенез. При проращивании в чашках Петри большинство семян F3 образовывала нормальные проростки, однако небольшая часть (0,7%) не развивалась после прорастания. У аномальных проростков наблюдали неразвернутые семядоли, при этом не было настоящего корня (рис. 31 g, h). Это согласуется с более ранними дефектами развития гипофиза, играющего решающую роль в корнеобразовании. Некоторые из этих проростков также имели одиночные или даже тройные семядоли (рис. 31 i). Кроме того, наблюдались эпидермис аномалии эпидермиса (рис. 31 h), аналогично протодерме остановившихся на более ранних стадиях развития зародышей. При более длительном выдерживании в чашках Петри эти сеянцы никогда не развивали листья и погибали примерно через 3 недели после прорастания. ПЦР-анализ показал, что большинство из неспособных развиваться дальше проростков (44 из 54 протестированных) соответствовали гомозиготным мутантам *cul3a-1 cul3b-1*.

Катанин MEI-1 нематоды *Caenorhabditis elegans* является одним из немногих известных субстратов CUL3, о чем было сказано выше. MEI-1 относится к каталитической субъединице AAA-АТФазы, которая вместе с регуляторной субъединицей MEI-2 образует катаниноподобный гетеродимер (Srayko et al., 2000). Поскольку геном арабидопсиса кодирует гомолог каталитической субъединицы животного катанина (Burk et al., 2001; Stoppin-Mellet et al., 2002; Webb et al., 2002), мы проверили, накапливается ли этот белок в двойном мутанте *cul3a cul3b*. Иммунодетекция растворимых белковых экстрактов с антителом против катанина в проростках двойных мутантов не обнаружила значительного увеличения растительного катаниноподобного белка у мутантов арабидопсиса (рис. 31 j).

4.4 Выводы

4.4.1 Мутанты арабидопсиса *cul3a-1 cul3b-1* останавливают свое развитие на нескольких стадиях эмбриогенеза

Предыдущие исследования пролили свет на молекулярный состав лигаз E3 на основе CUL3 (обзор Pintard et al., 2004). Было обнаружено, что несколько белков ВТВ-домена взаимодействуют непосредственно с CUL3 и, таким образом, могут функционировать как субстрат-специфические адаптеры. В то время как делящиеся дрожжи содержат только три белка, содержащих ВТВ домены, у *S. elegans*, *D. melanogaster* и человека таких белков было предсказано 105, 141 и 208 соответственно (Geyer et al., 2003). У растений белки с доменом ВТВ тоже образуют большое семейство, у *Arabidopsis thaliana* было идентифицировано 76 таких белков (Dieterle et al., 2005). Наличие такого большого количества ВТВ белков предполагает, что E3 лигазы на основе CUL3 должны иметь множественные функции и, вероятно, воздействовать на активность различных сигнальных путей у всех высших эукариот. Соответственно, было продемонстрировано, что CUL3 необходим многоклеточным животным (см. ниже), в отличие от почкующихся дрожжей (Michel et al., 2003) и делящихся дрожжей (Geyer et al., 2003). У *S. elegans* CUL3 образует комплекс с ВТВ-белком MEL-26 для разрушения белка MEI-1, разъединяющего микротрубочки, у эмбрионов на ранних стадиях (Pintard et al., 2004). Таким образом, потеря CUL3 приводит к нарушению цитокинеза у одноклеточных зародышей (Kurz et al., 2002). У мышей нокаут CUL3 вызывает эмбриональный летальный фенотип (Singer et al., 1999), сопровождающийся формированием аномалиями развития как зародыша, так и внеэмбриональных тканей.

Мы исследовали функцию CUL3 у модельного растения *Arabidopsis thaliana*. В отличие от исследованных многоклеточных животных, геном *Arabidopsis* кодирует два CUL3-родственных белка (Shen et al., 2002). Некоторые наблюдения предполагают, что оба белка имеют в значительной степени повторяющиеся

функции: (1) два растительных белка CUL3-типа демонстрируют 88% идентичности на уровне аминокислотной последовательности; (2) гены *CUL3A* и *CUL3B* демонстрируют перекрывающиеся паттерны экспрессии на разных стадиях развития растения (Dieterle et al., 2005; Weber et al., 2005, Thomann et al., 2005); (3) что наиболее интересно, как белок CUL3A, так и CUL3B взаимодействуют с одними и теми же белками ВТВ-домена арабидопсиса (Dieterle et al., 2005). Поскольку в наших исследованиях отдельные мутанты с инсерцией Т-ДНК в соответствующие гены, *cul3a* (Dieterle et al., 2005) и *cul3b* демонстрировали только малозаметный аномальный фенотип или не проявляли его вообще, мы сконструировали двойной мутант *cul3a cul3b*. Подобно многоклеточным, у растений функция *CUL3* необходима для их развития, так как потеря функции этого гена серьезно влияет на формирование зародыша и полностью нарушает постэмбриональное развитие. Зародыши и семена мутантов арабидопсиса задерживают свое развитие на разных стадиях. Наши результаты согласуются с двумя появившимися вскоре после нашего открытия сообщениями, которые также демонстрировали, что CUL3 необходим для развития (Figueroa et al., 2005; Gingerich et al., 2005). Кроме того, мы обнаружили, что у двойного мутанта *cul3a cul3b* большинство из зародышей прекращают развитие на сердечковидной стадии, а изменения в формировании паттерна развития зародыша, суспензора и эндосперма обнаруживаются уже на глобулярной стадии.

Поскольку геном арабидопсиса кодирует белки, последовательность которых родственна белкам MEL-26 и MEI-1 нематод (Dieterle et al., 2005; Weber et al., 2005; Thomann et al., 2005), мы предположили, что мутант *cul3a-1 cul3b-1* может проявлять нарушения в формировании цитоскелета. Однако мы не наблюдали экстремальных аномалий у зародыша, подобно тем, которые были обнаружены у зародышей некоторых групп мутантов *pilz* и *titan* (Liu, Meinke, 1998; Mayer et al., 1999; McElver et al., 2000), у которых дефекты цитоскелета значительно затрудняют митоз и цитокинез. Более того, мы не обнаружили более высокого накопления растительного катаниноподобного белка в экстрактах, выделенных из проростков двойного гомозиготного мутанта *cul3a cul3b* по сравнению с проростками растений

дикого типа, взятыми на аналогичной стадии развития. Мы также не смогли продемонстрировать взаимодействие между катанином арабидопсиса и ближайшим гомологом арабидопсиса MEL-26 с помощью двухгибридного анализа дрожжей (данные не показаны). Тем не менее, эндосперм двойного мутанта *cul3a cul3b* обнаруживал заметные дефекты и /или задержку целлюляризации, а некоторые клетки глобулярных и ранних сердечковидных зародышей были увеличены в размерах и демонстрировали аномальную форму. Учитывая эти наблюдения, мы не исключаем возможную роль, которую функция CUL3 может играть в динамике микротрубочек.

4.4.2 *Играет ли CUL3 роль в контроле клеточного цикла?*

Рецессивные мутации основных генов-регуляторов клеточного цикла у растений, должны приводить к летальности гаметофита или зародыша на ранних стадиях развития. Подобное было описано для двух основных куллиновых E3 лигаз, играющих ключевую роль в контроле клеточного цикла: SCF, который контролирует переход фаз G1/S (по крайней мере, у грибов и многоклеточных животных), и комплекса, стимулирующего анафазу, APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), который контролирует митотическое прогрессию и завершение митоза (Vodermaier, 2004). Таким образом, мутация гена *CUL1* арабидопсиса, кодирующего каркасный белок SCF, снижала гаметофитное наследование и приводила к ранней эмбриональной летальности на стадии зиготы (Hellmann et al., 2003; Shen et al., 2002), тогда как потеря функции связанной с куллином субъединицы APC2, субъединицы APC/C, нарушает женский мегагаметогенез (Carron et al., 2003). В отличие от этих мутантов, нарушение *CUL3* вызывает остановку развития зародыша на более поздних стадиях; некоторые из них даже смогли завершить эмбриогенез. Этот результат не исключает возможности того, что регуляторные белки клеточного цикла являются мишенью растительных E3 лигаз, содержащих *CUL3*, а также указывает на то, что их накопление не вызывает специфической остановки клеточного цикла. Интересно,

что у мышей нокаут *CUL3* останавливал накопление циклина E у эмбрионов и обнаруживал аномальную регуляцию клеточного цикла (Singer et al., 1999). Однако следует отметить, что типичный класс циклинов E-типа не существует в растениях (Vandepoele et al., 2002).

4.4.3 Все ли растительные E3 лигазы на основе *CUL* регулируют биосинтез фитогормонов и/или передачу сигналов?

Убиквитин-26S-протеасомный путь, по-видимому, играет ключевую роль в регулировании действия большинства растительных гормонов (Smalle, Vierstra, 2004). В частности, установлено, что SCF-подобные комплексы E3 лигаз участвуют в передаче сигналов ауксином (Gray et al., 2001), жасмонатом (Xu et al., 2002), гиббереллином (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003) и этиленом (Guo, Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003). Более того, мутации в гене *HOBBIT*, кодирующем предполагаемый компонент APC/C, также указывают на роль этой E3 лигазы в ауксин-опосредованных реакциях деления и дифференцировки клеток (Blilou et al., 2002).

Исследования показали, что ETO1, белок ВТВ-домена арабидопсиса, контролирует стабильность ACS5, являющейся частью синтаз 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, которая катализирует лимитирующую стадию биосинтеза этилена (Wang et al., 2004). ETO1 физически взаимодействует с *CUL3A* и, таким образом, может быть первым идентифицированным субстратом растительной E3 лигазы на основе *CUL3*. Однако маловероятно, что большинство фенотипов зародышей у *cul3a-1 cul3b-1* являются следствием перепроизводства этилена.

Примечательно, что двойной мутант *cul3a-1 cul3b-1* демонстрировал аномальное деление гипофизиса, клетки-основателя будущей корневой меристемы, и не мог сформировать нормальный суспензор. Следовательно, те немногие мутанты, которые в конце концов завершили эмбриогенез, были неспособны продуцировать нормальный первичный корень (рис. 31 g, h). Было

показано, что на глобулярной и сердечковидной стадиях ауксин накапливается в гипофизарных клетках (Friml et al., 2003). В разделе 4.2.1 мы уже упоминали про значение убиквитин-протеасомного пути растений, в том числе и для передачи ауксиновых сигналов (Hellmann, Estelle, 2002; Brukhin, Morozova, 2011). Интересно, что дефекты при закладке нормальных гипофизарных и суспензорных клеток ранее были описаны у нескольких нечувствительных к ауксину мутантов, таких как *monopteros (mp)* (Berleth, Jürgens, 1993), *bodenlos (bdl)* (Hamann et al., 1999) и у устойчивого к ауксину *б (axrб)* (Hobbie et al., 2000), а также в описанном нами мутанте RPN1a субъединицы протеасомы 26S *rpn1a* (Brukhin et al., 2005b). При этом мутации *axrб* влияют на способность CUL1 арабидопсиса собираться в стабильный комплекс SCF с TIR1 (Hellmann et al., 2003). Была предложена модель, согласно которой комплекс SCFTIR1 разрушает белок BDL, тем самым активируя MP (Hamann et al., 2002; Hellmann et al., 2003). Остается вопросом, участвуют ли белки CUL3 арабидопсиса также и в передаче сигнала ауксина.

4.5 Роль E3 лигаз, содержащих CUL4 (CRL4s). Комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с MSI1 и является необходимым для поддержания родительского импринтинга гена MEDEA.

Еще один важный класс куллинсодержащих убиквитинлигаз (E3), который задействован в развитии и размножении растений — это класс E3 убиквитинлигаз, состоящих из CUL4, DDB1 и белка WD40, который, действует как субстратный рецептор. E3-лигазы на основе CUL4 (CRL4s) выполняют важные функции на уровне хроматина, включая реакцию на повреждения ДНК у многоклеточных животных, растений и у дрожжей, а также в сайленсинге гетерохроматина. Среди предполагаемых рецепторов CRL4 мы идентифицировали MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), принадлежащий к эволюционно консервативному семейству белков. MSI1-подобные белки играют большую роль в функционировании разных белковых комплексов, включая эпигенетический регуляторный репрессивный комплекс Polycomb 2 (PRC2) (Dumbliauskas et al.,

2011; Schmidt et al., 2013; Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019; Brukhin, Albertini, 2021). Мы получили доказательства того, что MSI1 арабидопсиса физически взаимодействует с DDB1A и является частью мультимерного белкового комплекса, включающего CUL4. Потеря функции CUL4 и DDB1 приводит к гибели зародышей. Интересно, что, как и у мутантов класса *fis*, мутанты *cul4* обнаруживают автономную инициацию эндосперма и утрату родительского импринтинга *MEDEA*, гена-мишени комплекса PRC2 арабидопсиса. Кроме того, после опыления у мутантов *cul4* накапливается как транскрипт *MEDEA*, так и белок. Наши исследования предоставили первые доказательства физической и функциональной связи между лигазой CUL4 E3 и комплексом PRC2, что указывает на новую роль убиквитинирования в подавлении экспрессии генов (Dumbliauskas et al., 2011).

В отличие от других E3 ферментов убиквитин-протеосомного цикла, состав E3 лигаз на основе CUL4 (CRL4s) был идентифицирован относительно недавно (Higa, Zhang, 2007). CUL4 связывает RBX1 для рекрутирования специфического убиквитин-конъюгирующего фермента E2, а также присоединяет адаптерный белок DDB1, который сам связывается с субстратным рецептором. С помощью аффинной очистки CRL4 из клеток млекопитающих были идентифицированы белки WD40 в качестве возможных субстратных рецепторов (Angers et al., 2006; He et al., 2006; Higa et al., 2006; Jin et al., 2006). Многие из этих белков, также называемые DDB1 и CUL4-ассоциированные факторы DCAF_s (сокр. от DDB1 and CUL4-Associated Factors), содержат мотивы WD_xR, необходимые для эффективного связывания DDB. Однако функциональная роль и субстраты большинства из них оставались неизвестными. У человека было предсказано порядка 90 различных DCAF_s факторов (He et al, 2006), что указывает на существование большого количества CRL4. Сходное количество белков с повторами WD40, несущих по крайней мере один мотив WD_xR, было идентифицировано в модельном растении *Arabidopsis thaliana* (Lee et al, 2008). Одним из предсказанных DCAF_s арабидопсиса является MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), который принадлежит к эволюционно

консервативному семейству белков (Hennig et al, 2005), членом-основателем которого является MSI1 дрожжей (Ruggieri et al, 1989). И у многоклеточных животных, и у растений MSI1-подобные белки являются частью нескольких белковых комплексов, участвующих в различных функциях хроматина (Hennig et al, 2005). В частности, было предположено, что MSI1 поддерживает эпигенетическую память при развитии организма путем таргетирования хроматина комплексами молчания (Brukhin, Baskar, 2019; Brukhin, Albertini, 2021).

У арабидопсиса MSI1 необходим для репродуктивного развития (Köhler et al, 2003; Guitton et al, 2004). Было обнаружено, что у мутантов *msi1* семена abortируются, если мутантная аллель наследуется по материнской линии независимо от отцовского вклада. В таких семенах в эндосперме не происходит формирование клеточных стенок между ядрами, при этом зародыш демонстрирует дефекты клеточного цикла и развития. Мутанты *msi1* обладают высокой пенетрантностью признаков автономного развития эндосперма в отсутствие оплодотворения, а также образуют редкие партеногенетические зародыши (Köhler et al, 2003; Guitton, Berger, 2005). MSI1 является частью комплекса FIS-PRC2 вместе с тремя другими белками, MEDEA (MEA), FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED2 (FIS2) и FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), которые необходимы для нормального развития семян (Köhler et al., 2003). MEA кодирует гистонметилтрансферазу, содержащую SET-домен, гомологичную Enhancer of Zeste у дрозофилы (Grossniklaus et al, 1998; Brukhin, Baskar, 2019), и регулирует импринтированную экспрессию самого себя, а также своего гена-мишени *PHERES1* (*PHE1*), кодирующего MADS- домен транскрипционного фактора (Köhler et al, 2005). Регуляция импринтинга с помощью FIS-PRC2 включает молчание отцовской аллели MEA и материнской аллели *PHE1*, соответственно (Köhler et al, 2005; Baroux et al, 2006; Gehring et al, 2006; Jullien et al, 2006). Напротив, авторепрессия материнской аллели MEA не зависит от FIS-PRC2 (Baroux et al, 2006).

Мы обнаружили, что все MSI1-подобные белки с повторами WD40 из различных организмов несут по крайней мере один консервативный мотив WDxR,

сигнатуру DCAFs. MSI1 арабидопсиса физически взаимодействует с DDB1A и является частью белкового комплекса CUL4-DDB1A-MSI1. Функциональный анализ показал, что CUL4, а также гомологи DDB1 арабидопсиса необходимы для нормального формирования семян. Важно отметить, что мутация *cul4* приводит к автономному развитию эндосперма и потере родительского импринтинга гена *MEA*, то есть к реактивации отцовской аллели *MEA*, поддерживая при этом функциональную связь этой E3 лигазы и комплекса FIS-PRC2 (Dumbliauskas et al., 2011).

4.5.1 MSI-подобные белки представляют собой эволюционно консервативные белки WD40, которые содержат мотивы WDxR

Самый большой класс DCAFs представляют собой белки, содержащие повторы WD40, которые взаимодействуют с DDB1 посредством одного или нескольких консервативных мотивов WDxR (Lee and Zhou, 2007). Геном арабидопсиса кодирует 237 белков с повторами WD40; однако только часть из них (белки ~ 80) несут один или несколько мотивов WDxR (Lee et al, 2008 и наши неопубликованные данные). Из этих белков мы идентифицировали MSI1 и четыре других родственных MSI1 белка арабидопсиса, названных MSI2-MSI5 (Hennig et al, 2005). При сравнении всех MSI1-подобных белков растительных и нерастительных организмов, оказалось, что большинство из них имеют высоко консервативный мотив WDxR (Рис. 32) (Dumbliauskas et al., 2011). У многоклеточных животных MSI1-подобные белки обнаруживают также второй WDxR мотив, менее консервативный у растений, он также присутствует у грибов. Следовательно, большинство, если не все MSI1-подобные белки, структурно родственны DCAFs.

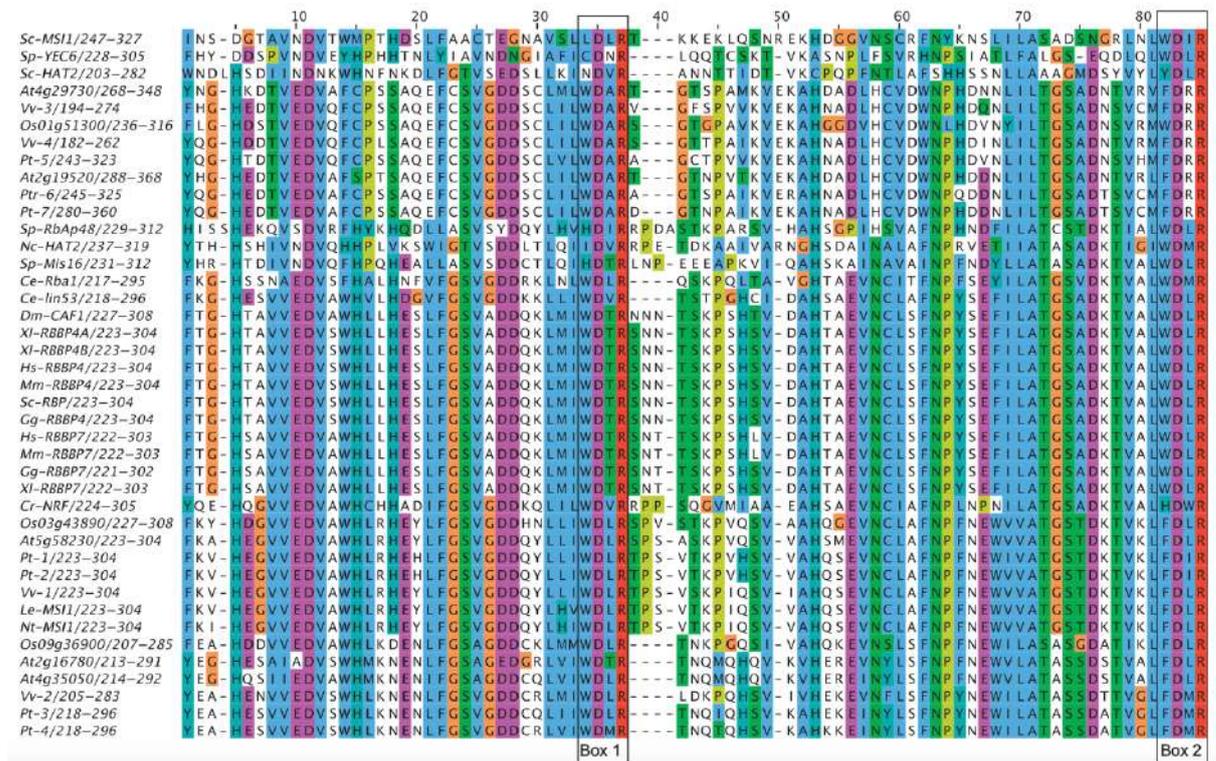


Рисунок 32 - Выравнивание MSI1-подобных белков и мотивов WDxR. Для идентификации MSI1-подобных белков с помощью алгоритма BLAST (Altschul et al., 1990) использовали все пять последовательностей MSI1-подобных белков арабидопсиса (MSI1, AT5G58230; MSI2, AT2G16780; MSI3, AT4G35050; MSI4, AT2G19520 и MSI5, AT4G29730). Для исследования мы использовали следующие базы данных: для *Oryza sativa* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>; Os03g43890; Os09g36900; Os01g51300); *Vitis vinifera* (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-whole-genome.html>; Vv-1 GSVIVP00030810001; Vv-2 GSVIVP00036121001; Vv-3 GSVIVP00016560001; Vv-4 GSVIVP00034167001); *Lycopersicon esculentum* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Le-MSI1 O22466.1); *Nicotiana tabacum* (NCBI; Nt-MSI1 ABY84675.1); *Homo sapiens* (NCBI; Hs-RBBP4 NP_005601.1; Hs-RBBP7 NP_002884.1); *Mus musculus* (NCBI; Mm-RBBP4 NP_033056.2; Mm-RBBP7 NP_033057.3); *Gallus gallus* (NCBI; Gg-RBBP4 Q9W7I5.3; Gg-RBBP7 Q9I8G9.1); *Drosophila melanogaster* (NCBI; Dm-CAF-1 NP_524354.1); *Caenorhabditis elegans* (NCBI; Ce-lin53 NP_492552.1; Ce-Rba1 NP_492551.1); *Xenopus laevis* (NCBI; XI-RBBP4B Q6INH0.3; XI-RBBP4A O93377.3; XI-RBBP7 Q8AVH1.1); *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>; Cr-NRF

XP_001696907.1); *Populus trichocarpa* (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; Pt-1 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1945; Pt-2 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XIV1179; Pt-3 gw1.IX.1159.1; Pt-4 estExt_fggenesh4_fgenesh4_fgenesh4_pg.C_LG_XIV1179; .C_LG_IV1464; Pt-5 eugene3.00440093; Pt-6 gw1.145.113.1; Pt-7 евген 3.02850001); *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI; Sp-RbAp48 O14021.1; Sp-YEC6 Q9Y825.1; Sp-Mis16 NP_587881.1); *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI; Sc-HAT2 P39984.1; Sc-MSI1 P13712.1; Sc-RBP1919423A) и *Neurospora crassa* (NCBI; Nc-HAT2 Q7S7N3.2). Все идентифицированные белки выравнивали с помощью программы Muscle v3.6 (Edgar, 2004). Неконсервативные участки белка были удалены с помощью GBlocks v0.91b при следующих настройках: минимальное количество последовательностей для консервативного положения: 21; минимальное количество последовательностей для фланговой позиции: 34; максимальное количество смежных неконсервативных позиций: 8; минимальная длина блока: 5; разрешенные гэнп-позиции: с половиной. Указаны положения двух консервативных мотивов WDxR (Box1 и Box2). (Dumbliauskas et al. 2011).

4.5.2 MSI1 у арабидопсиса ассоциируется с DDB1A и CUL4

Сначала мы исследовали, есть ли взаимодействие MSI1 с DDB1A с помощью дрожжевого двухгибридного анализа. Подобно DDB2 (Molinier et al, 2008), который служил в качестве положительного контроля, MSI1 и DDB1A демонстрировали взаимодействие, хотя оно было слабым, поскольку рост дрожжей обнаруживался только на среде (-LWH) (рис. 33А). Мы также подтвердили это взаимодействие с помощью анализа аффинной абсорбции *in vitro*. В этом эксперименте слитый белок между глутатионин-S-трансферазой (GST) и DDB1A, GST-DDB1A, инкубировали с транслированными *in vitro* мечеными ³⁵S-метионином MSI1 или DDB2. Соответственно, MSI1 и DDB2 осаждаются совместно с GST-DDB1A, а не только с GST (рис. 33В). Чтобы доказать физическое взаимодействие между обоими белками в растительных клетках, мы провели

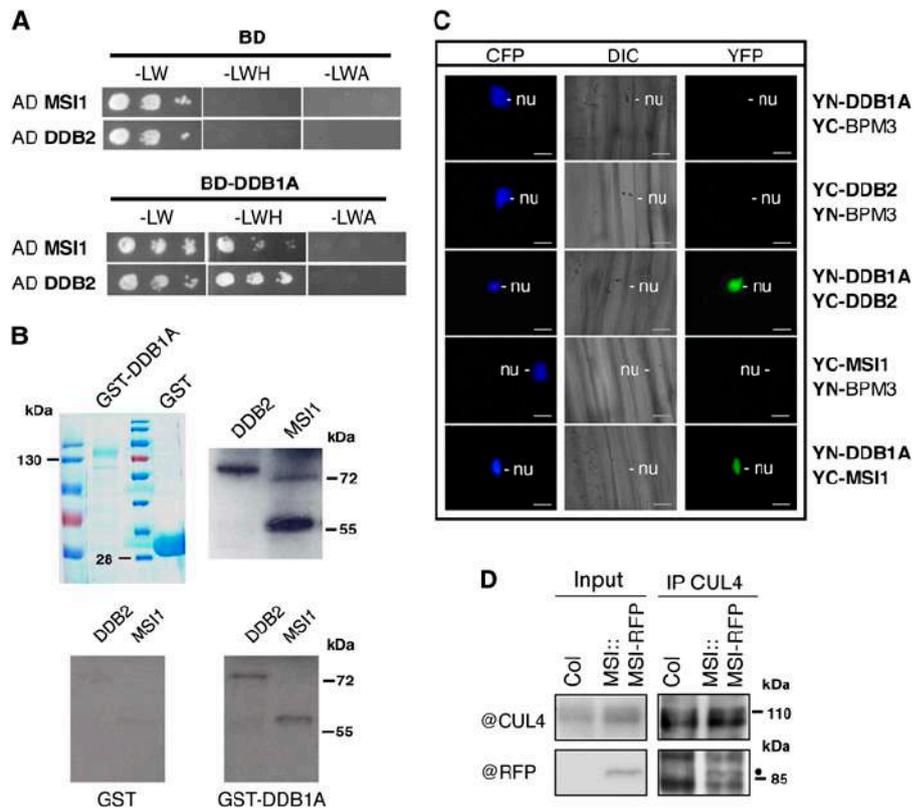


Рисунок 33 - MSI1 образует комплекс с DDB1A и CUL4. (A) Эксперименты с дрожжевой двухгибридной системой (Y2H), показывающие взаимодействие MSI1 с DDB1A. Серии разведения дрожжевых клеток, коэкспрессирующих указанные белки, выращивали в течение 3 дней при 28°C с селекцией при нежестких условиях реакции, LWH (Low Stringency Selection), и с селекцией при жестких условиях реакции, LWA (High Stringency Selection). В качестве положительного контроля использовали DDB2. (B) Взаимодействия при анализе Y2H были подтверждены с использованием белков GST или GST-DDB1A экспрессированных в бактериях и абсорбцией *in vitro*. На верхней панели показан белок GST-DDB1A (слева) и 5 мкл транслированных *in vitro* белков MSI1 и DDB2, меченных ³⁵S-Met (справа), которые использовались для взаимодействия (нижние панели). (C) BiFC YN-DDB1A/YC-MSI1. Различные комбинации плазмид, экспрессирующих указанные YN- и YC-слитые белки, которыми бомбардировали hypocotили выращенных в темноте проростков горчицы. Белок рецептора CUL3 BPM3, локализованный в ядре, использовали здесь в качестве отрицательного контроля. Для идентификации трансформированных клеток систематически включали контроль трансфекции

CPRF2, экспрессирующий слитый CFP в ядре (nu). Фотографии были сделаны через 5 часов после бомбардировки с помощью фильтров, специфичных для CFP (левые панели) и YFP (правые панели). Показаны дифференциально-интерференционно-контрастные (DIC) изображения (средние панели). Воспроизведение функционального YFP, обнаруженное по флуоресценции YFP, происходит только в ядре, содержащем как MSI1, так и DDB2. Шкала = 20 мкм. (D) Взаимодействие CUL4 и MSI1 в естественных условиях. Для анализа иммунопреципитации (IP) с использованием антитела против CUL4 использовали растения экспрессирующие MSI1-RFP и контрольные растения дикого типа. При иммунопреципитации с использованием антител против CUL4 и анти-RFP были обнаружены как CUL4 (верхняя правая панель), так и MSI1-RFP (нижняя правая панель) соответственно. Жирная точка указывает на бэнд белка MSI1-RFP. (Dumbliauskas et al., 2011).

эксперименты по бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC). Этиолированные гипокотили горчицы бомбардировали совместно плазмидами YC-MSI1 и YN-DDB1A. Сильный сигнал желтого флуоресцирующего белка (YFP) наблюдали в ядрах 81% исследованных клеток (35/43; рис. 33С). Эти данные аналогичны данным, полученным с трансформированными клетками положительного контроля YN-DDB1A+YC-DDB2 (43/46). Слабый флуоресцентный сигнал обнаруживали после бомбардировки ядер следующими комбинациями плазмид: YN-DDB1A+YC-BPM3 (9/35) и YN-BPM3+YC-MSI1 (2/27), где BPM3 (белок ВТВ/POZ-МАТН3, кодируемый геном At2g39760) представляет собой рецептор ядерной убиквитинлигазы 3 (CLR3) с куллиновым кольцом, используемый в этом эксперименте в качестве отрицательного контроля. Можно заключить, что в совокупности, полученные нами данные, ясно демонстрируют физическое взаимодействие между DDB1A и MSI1.

Затем мы исследовали, является ли MSI1 также и частью белкового комплекса, содержащего CUL4 арабидопсиса. Для этого была осуществлена иммунопреципитация CUL4 из растений арабидопсиса, экспрессирующих слитый

белок MSI1-RFP под контролем его собственного промотора (Chen et al, 2008). В результате MSI1 был успешно ко-иммунопреципитирован (рис. 33D). Таким образом, поскольку CUL4 взаимодействует с DDB1A (Bernhardt et al, 2006), можно заключить, что полученные результаты подтверждают существование у арабидопсиса белкового комплекса CUL4-DDB1A-MSI1 (Dumbliauskas et al., 2011).

4.5.3 CUL4 и его адаптеры DDB1A и DDB1B необходимы для нормального протекания эмбриогенеза

У арабидопсиса потеря функции MSI1 вызывает материнский эффект, сопровождающийся эмбриолетальностью, приводящей к абортивности семян на ранних стадиях развития (Köhler et al, 2003). Ранее был изолирован мутант со вставкой Т-ДНК, *cul4-1* (Bernhardt et al., 2006), у которого экспрессия CUL4 была значительно снижена. Хотя и были получены жизнеспособные гомозиготные мутанты *cul4-1*, эти растения проявляли различные аномалии развития (Bernhardt et al., 2006). Мы обнаружили, что самоопыляющиеся гомозиготные растения *cul4-1* демонстрируют отклонения в развитии семян, что в итоге приводит к их абортивности (рис. 34). Далее, мы провели эмбриологические исследования просветленных препаратов гомозиготных мутантных семян *cul4-1* на разных стадиях развития (рис. 35). Уже на стадии октанта наблюдалась более низкая пролиферация эндосперма (рис. 35 В), в то время как на более поздних стадиях развития семян были заметны аномально большие ядра эндосперма и задержка развития зародыша (рис. 35 D и F). Из-за плейотропной и гипоморфной природы аллели *cul4-1* мы пытались идентифицировать аморфные мутанты *cul4* с потерей функции. Мы провели скрининг коллекции линий со вставками Т-ДНК арабидопсиса (Ríos et al., 2002). Были идентифицированы две вставки Т-ДНК в кодирующей области CUL4, названные *cul4-2* и *cul4-3* (рис. 36). Мутанты *cul4-2* и *cul4-3* были подвергнуты обратному скрещиванию с растениями дикого типа. Саузерн-блот подтвердил одиночные вставки Т-ДНК в геномы исследуемых мутантных растений. Далее были генотипированы 137 и 72 растений потомков от

самоопыленных мутантных растений *cul4-2* и *cul4-3*, соответственно, однако мы не смогли идентифицировать гомозиготные мутанты, тем самым предположили, что *CUL4* является важным геном у арабидопсиса (Dumbliauskas et al., 2011).

Поскольку обе линии содержали одиночные вставки Т-ДНК с встроенным селективным маркером гигромицином, мы провели самоопыление гетерозиготных растений *cul4-2* и *cul4-3* и проанализировали расщепление маркера у полученного потомства (табл. 12).

Таблица 12 - Генетический анализ мутантов *cul4*.

Родительские генотипы (женский × мужской)	Hyg ^R	Hyg ^S	<i>n</i>	<i>P</i>	TE _F (%)	TE _M (%)
<i>cul4-2</i> (самоопыление)	470	296	766	0.002	NA	NA
<i>cul4-3</i> (самоопыление)	474	236	710	0.936	NA	NA
Col-0 × <i>cul4-2</i>	213	251	464	0.077	NA	84.9%
<i>cul4-2</i> × Col-0	198	236	434	0.068	83.9%	NA
Col-0 × <i>cul4-3</i>	229	256	485	0.220	NA	89.4%
<i>cul4-3</i> × Col-0	221	254	475	0.130	87.0%	NA

Устойчивость к гигромицину (Hyg^R, проростки, устойчивые к гигромицину; Hyg^S, проростки, чувствительные к гигромицину) использовали в качестве маркера для оценки аллелей *cul4-2* и *cul4-3*. Эффективность передачи была рассчитана в соответствии с методикой, описанной у Howden et al. (1998): $TE = \text{Hyg}^R/\text{Hyg}^S \times 100\%$. Значение *P*, основанное на коэффициенте сегрегации 2:1, ожидаемом при зиготической эмбрио летальной мутации, и 1:1, ожидаемом для нормальной передачи при реципрокных скрещиваниях; TE_F, эффективность передачи по женской линии; TE_M, эффективность мужской передачи; NA, не применимо. При значении *P* < 0,05 нулевая гипотеза отвергается. (Dumbliauskas et al. 2011).

Генетический анализ выявил отношение сегрегации потомства *cul4-3* близкое к 2:1, что согласуется с наличием почти полной пенетрантности

зиготической эмбрио летальности. Для аллели *cul4-2* коэффициент сегрегации маркера был немного ниже 2:1, что предполагает слабый дефект гаметофитной передачи. Затем мы провели реципрокные скрещивания мутантов обоих аллелей с растениями дикого типа. Эффективность передачи маркера была несколько снижена как через мужские, так и через женские гаметофиты (табл. 12).

Далее мы исследовали зрелые стручки на наличие недоразвитых семян. Количество абортированных семян соответствовало зиготической эмбрио летальности, при которой ожидается соотношение абортированных семян к нормальным как 1:3 (таблица 13; рисунок 34). Для дальнейшего выяснения того, на какой стадии развития останавливается эмбриогенез, мы проанализировали просветленные

Таблица 13 - Анализ семян в зрелых стручках.

Родительский генотип (женский × мужской)	Нормальных семян	Абортированных семян	N проверенных семян	P
Col-0 × Col-0	512	8 (1.5%)	520	NA
<i>cul4-2</i> ^{+/-} (самоопыление)	1129	444 (28.2%)	1573	0.003
<i>cul4-3</i> ^{+/-} (самоопыление)	1030	383 (27.1%)	1413	0.065
<i>ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1</i> (самоопыление)	215	81 (27.4%)	296	0.347

Зрелые стручки анализировали на наличие недоразвитых семян. Значение P, основанное на соотношении 3:1, как ожидается для зиготической эмбриолетальности. N/A, не применимо. При значении P < 0,05 нулевая гипотеза отвергается (Dumbliauskas et al. 2011).

семена из стручков от самоопыляющихся мутантных растений *cul4-2* на разных стадиях развития. На стадии октанта мутантные семена демонстрировали небольшое количество крупных ядер в эндосперме (рис. 35H). На более поздних стадиях зародыши останавливали свое развитие на глобулярной стадии, что

сопровождалось аномальной формой зародыша и дефектами клеточных делений как в суспензоре, так и в самом зародыше (рис. 35 J и L). Более того, в семенах гомозиготных мутантных растений *cul4-2* эндосперм всегда был более

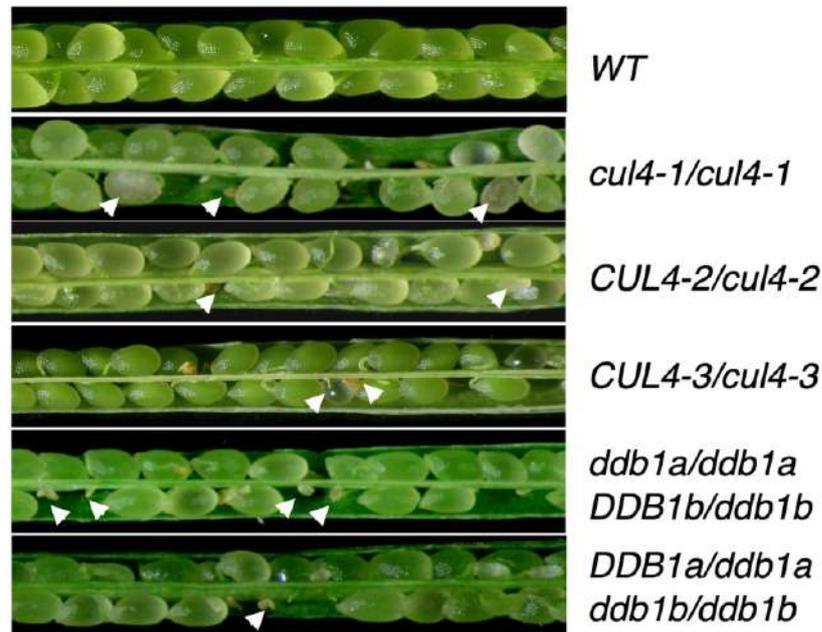


Рисунок 34 - Фенотип стручков гомо- и гетерозиготных мутантов *cul4* и *ddb1*. Стрелки указывают на семена, прекратившие свое развитие. (Dumbliauskas et al. 2011).

недоразвитым с намного меньшим количеством увеличенных аномальных ядер. Позже, когда семена дикого типа были на стадии изогнутых семядолей, остановившиеся в развитии мутантные семена дегенерировали, что указывает на полную остановку их формирования, а не только на задержку развития. Аналогичные результаты были получены с мутантной аллелью *cul4-3* (рис. 37 B).

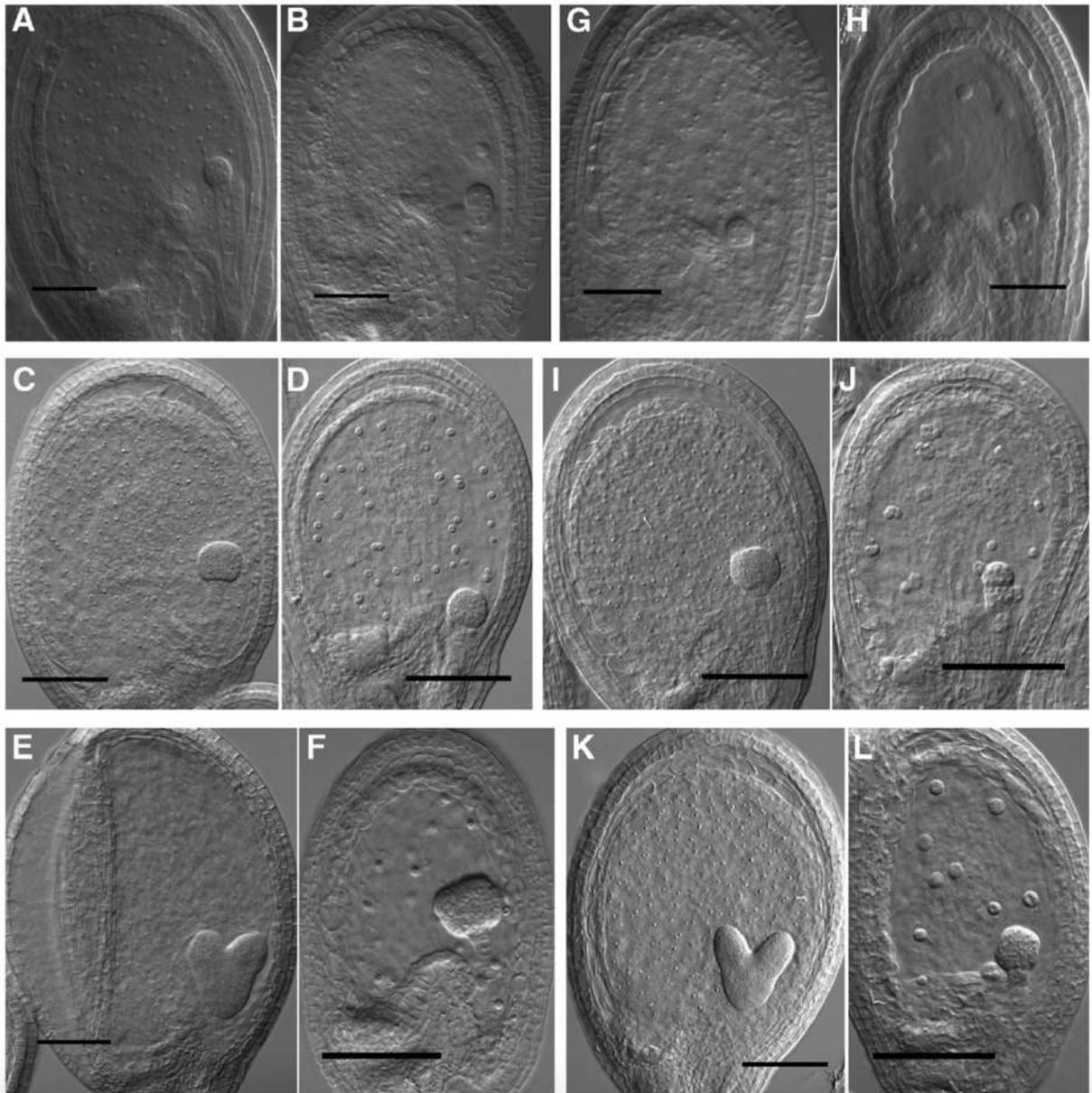


Рисунок 35 - Отклонения в развитии зародыша и эндосперма в мутантных семенах *cul4*.

(A) Просветленное семя с зародышем на стадии октанта из того же стручка гомозиготного мутанта *cul4-1*, что и семя, показанное на (B). (B) Мутантный зародыш и эндосперм со сниженной пролиферацией и крупными ядрами. (C) Просветленное семя с зародышем на глобулярной стадии из того же стручка гомозиготного мутанта *cul4-1*, что и семя, показанное на (D). (D) Замедленное развитие семени у мутанта, эндосперм содержит аномально крупные ядра. (E) Просветленное семя с зародышем на сердцевидной стадии из того же стручка гомозиготного мутантного растения *cul4-1*, что и семя, показанное на (F). (F)

Замедленный мутант со сниженной пролиферацией и увеличенными ядрами эндосперма. (G) Замедленное развитие семени с зародышем на стадии октанта из того же стручка, что и семя, показанное на (H). (H) гомозиготный мутант *cul4-2* с меньшим количеством крупных ядер эндосперма. (I) Просветленное семя с зародышем на глобулярной стадии из того же стручка, что и семя, показанное на (J). (J) Замедленный в развитии зародыш гомозиготного мутанта *cul4-2* с увеличенными и агрегированными ядрами эндосперма. (K) Просветленное семя с зародышем на сердечковидной стадии из того же стручка, что и семя, показанное на (L). (L) Замедленное в развитии семя гомозиготного мутанта *cul4-2* с меньшим количеством увеличенных в размере по сравнению с диким типом ядер эндосперма. Масштабная линейка = 50 мкм (A–B, G–H); 100 мкм (C–F, I–L). Dumbliauskas et al. 2011.

Поскольку CUL4 взаимодействует с DDB1, образуя комплекс CRL4-E3 лигаза, мы также исследовали, необходим ли DDB1 для нормального эмбриогенеза. Геном арабидопсиса кодирует два экспрессирующихся родственных белка DDB1, которые называются *DDB1A* (At4g05420) и *DDB1B* (At4g21100), демонстрирующих 89% идентичности на уровне последовательности аминокислот (Schroeder et al, 2002). Мутанты с потерей функции *DDB1A* оказывались жизнеспособными (Molinier et al, 2008). Поэтому мы осуществили поиск мутантов со вставкой Т-ДНК в родственном гене *DDB1B*. Нам удалось идентифицировать один мутант в коллекции SALK (SALK 061944) (Alonso et al., 2003), названный *ddb1b-1*. В аллеле *ddb1b-1* Т-ДНК прерывает кодирующую последовательность в последнем экзоне (рис. 36 В). Гомозиготные мутантные растения *ddb1b-1* развивались нормально и были полностью фертильны. Чтобы проверить, действуют ли *DDB1A* и *DDB1B* избыточно при эмбриогенезе, мутантные растения *ddb1a-2* использовали для

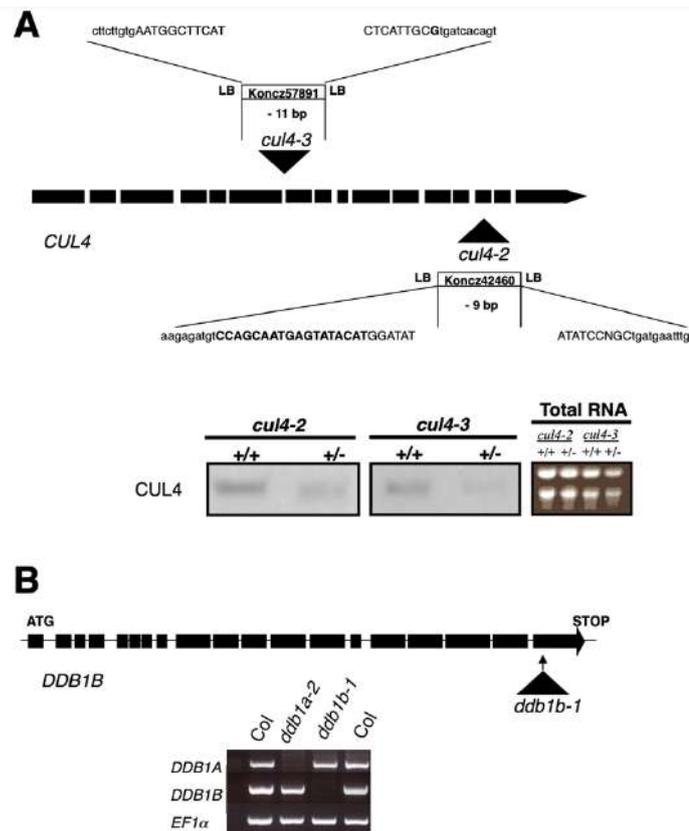


Рисунок 36 - Мутантные линии со вставкой с Т-ДНК в гены *CUL4* и *DDB1B*.

(А) Схематическое изображение и молекулярная характеристика вставок Т-ДНК в ген *CUL4*. У *cul4-2* и *cul4-3* Т-ДНК встроены в 14-й экзон и 7-й интрон соответственно. Уровень транскрипта *CUL4* (нижняя панель) определяли с помощью Нозерн-блоттинга, он был пониженным как у гетерозиготных растений *cul4-2*, так и у *cul4-3*. (В) Схематическое изображение и молекулярная характеристика вставки Т-ДНК *DDB1B*. Этот мутант был идентифицирован в коллекции Т-ДНК SALK (SALK 061944). В *ddb1b-1* Т-ДНК встроена в 19-й и последний экзон. Для анализа экспрессии *DDB1B* в растениях дикого типа, *ddb1a-2* (Molinier et al., 2008) и *ddb1b-1* осуществляли ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров. Сигнал *DDB1B* не был обнаружен даже после 35 циклов. Однако экспрессия *DDB1A* была обнаружена в *ddb1b-1* с использованием ранее описанных *DDB1A*-специфических праймеров e-f (см. Molinier et al., 2008). В качестве контроля использовали праймеры *EF1α* (Dumbliauskas et al., 2011).

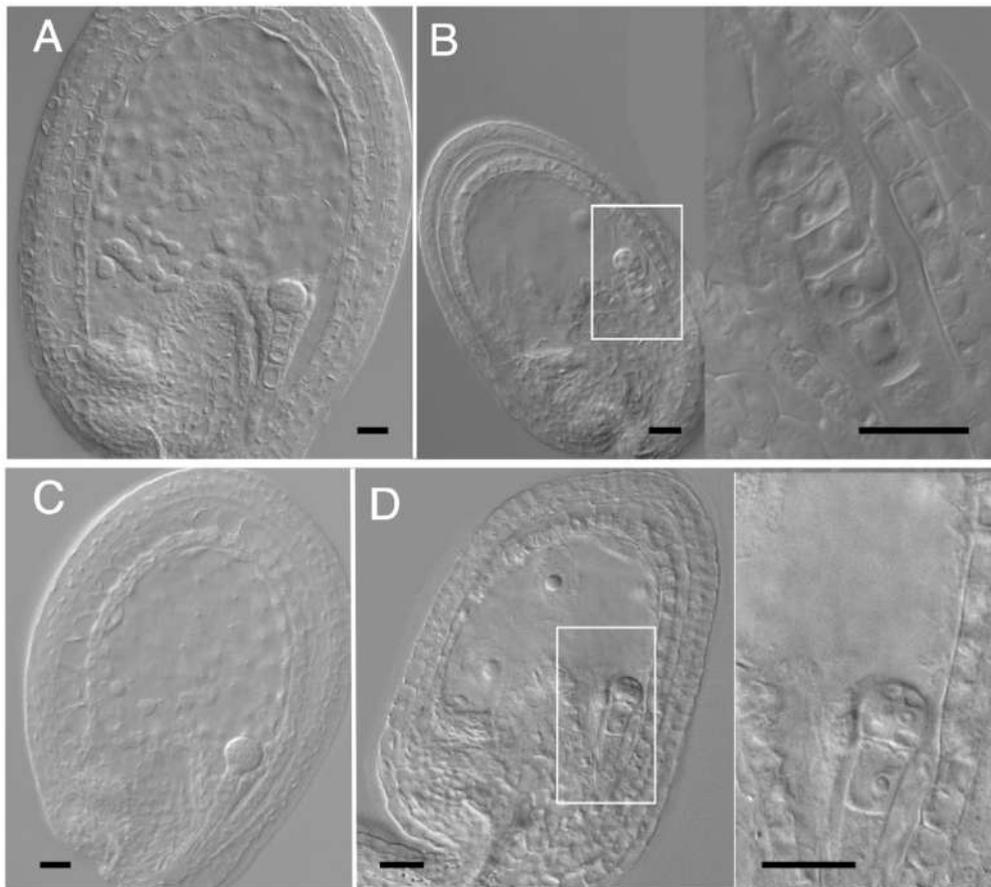


Рисунок 37 - Отклонения в развитии зародыша и эндосперма в семенах мутантов *cul4-3* и *ddb1a ddb1b*. (A) Нормальное семя из того же стручка, что и семя, показанное на (B). (B) Замедленное развитие гомозиготного зародыша и уменьшенное количество ядер в эндосперме у мутанта *cul4-3*. Правая панель представляет собой увеличение зародыша на том же изображении. (C) Нормальное семя из того же стручка, что и семя, показанное в (D). (D) Задержка развития зародыша и меньшее количество более крупных ядер эндосперма в стручке самоопыленного мутанта *ddb1a DDB1B/ddb1b*. Правая панель представляет собой увеличение зародыша на том же изображении. Масштабная линейка = 20 мкм. (Dumbliauskas et al., 2011).

опыления гомозиготного мутантного растения *ddb1b-1*. Из потомства, полученного от этого скрещивания мы выбрали растения F2 *DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1/ddb1b-1* (обозначаемые нами как *DDB1A/ddb1a ddb1b*) и *ddb1a-2/ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1*

(обозначаемые нами как *ddb1a DDB1B/ddb1b*). Поскольку мутанты *ddb1a-2* и *ddb1b-1* несут один и тот же селективный маркер, для дальнейших генетических анализов было использовано генотипирование на основе ПЦР. Среди потомства самоопыляющихся растений *DDB1A/ddb1a ddb1b* и *ddb1a DDB1B/ddb1b* не было выявлено двойных мутантов с нулевыми аллелями при анализе ~60 растений для каждого генотипа (табл. 14).

Таблица 14 - Генетический анализ мутантных растений *ddb1a ddb1b*

Генотипирование.	Двойной гомозиготный (-/-; -/-).	Гетерозиготный по одной аллели (+/-; +/-)	Дикая аллель	значение			
				n	P	TE _F (%)	TE _M (%)
<i>DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1</i> (selfed)	0	36	20	56	0.567	NA	NA
<i>ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1</i> (selfed)	0	38	25	63	0.285	NA	NA
<i>ddb1b-1 × DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1</i>	0	26	68	94	<0.0001	NA	38.2%
<i>DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1 × ddb1b-1</i>	0	44	45	89	0.9156	97.8%	NA
<i>ddb1a-2 × ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1</i>	0	43	41	84	0.8273	NA	104.8%
<i>ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1 × ddb1a-2</i>	0	20	66	86	<0.0001	30.3%	NA

TE_F, эффективность женской передачи; TE_M, эффективность мужской передачи; N/A, не применимо. Было прогенотипировано потомство растений *DDB1A/ddb1a*, *ddb1b u ddb1a*, *DDB1B/ddb1b*. Двойной мутант не был обнаружен. P, основано на коэффициенте сегрегации 2:1, ожидаемом при зиготической эмбриолетальной мутации, и 1:1 для реципрокных скрещиваний, ожидаемых при нормальной передаче. При значении P <0,05 нулевая гипотеза отвергается. (Dumbliuskas et al., 2011).

Затем мы оценивали передачу каждого из генов *DDB1* через мужской и женский гаметофиты (таблица 14). Реципрокные скрещивания между различными генотипами показали, что два этих гена вносят не одинаковый вклад в развитие и/или функцию гаметофита, о чем свидетельствуют разные дефекты передачи: в то время как в отсутствие аллели *DDB1B* для нормальной передачи через мужской гаметофит требуется аллель *DDB1A*, для женского гаметофита наблюдалось обратное.

Количество абортированных семян у самоопыляемых растений *ddb1a DDB1B/ddb1b* соответствовало фенотипу зиготической эмбриолетальности (таблица 14). Наблюдения просветленных семян под световым микроскопом показали, что зародыши из семян двойных гомозиготных растений *ddb1a ddb1b*, полученных от самоопыленных мутантов *DDB1A/ddb1a ddb1b* или *ddb1a DDB1B/ddb1b* (рис. 37D) задерживаются на глобулярной стадии с фенотипом,

напоминающим фенотип мутантов *cul4*. Таким образом, для нормального развития зародыша и эндосперма необходимы как *CULA*, так и *DDB1A/B*.

4.5.4 *CULA* экспрессируется во время эмбриогенеза

Чтобы определить характер экспрессии *CULA* в репродуктивных тканях и во время эмбриогенеза, мы провели эксперименты по гибридизации мРНК *in situ* на срезах цветочных почек и развивающихся стручков с использованием *CULA*-специфических антисмысловых и смысловых контрольных зондов. Транскрипты *CULA* были обнаружены в тканях молодых цветочных почек, то есть в лепестках, тычинках и плодолистиках (рис. 38 А). Отчетливый сигнал наблюдался в формирующихся семязачатках (рис. 38 В), но не в развивающемся зародышевом мешке (рис. 38Е). После оплодотворения экспрессия *CULA* была отмечена в развивающемся зародыше (рис. 38 С, D, G – L). Интенсивность сигнала уменьшилась после сердечковидной стадии (рис. 38 I – G). Наблюдаемый паттерн экспрессии *CULA* коррелирует с потребностью в нем при развитии зародыша. В клетках эндосперма гибридизационный сигнал был низким, но его можно было обнаружить на всех стадиях развития семени (рис. 38 С, D, G – L). В целом, паттерн экспрессии *CULA* в развивающихся семенах согласуется с фенотипом потери функции *CULA* (Dumbliauskas et al., 2011).

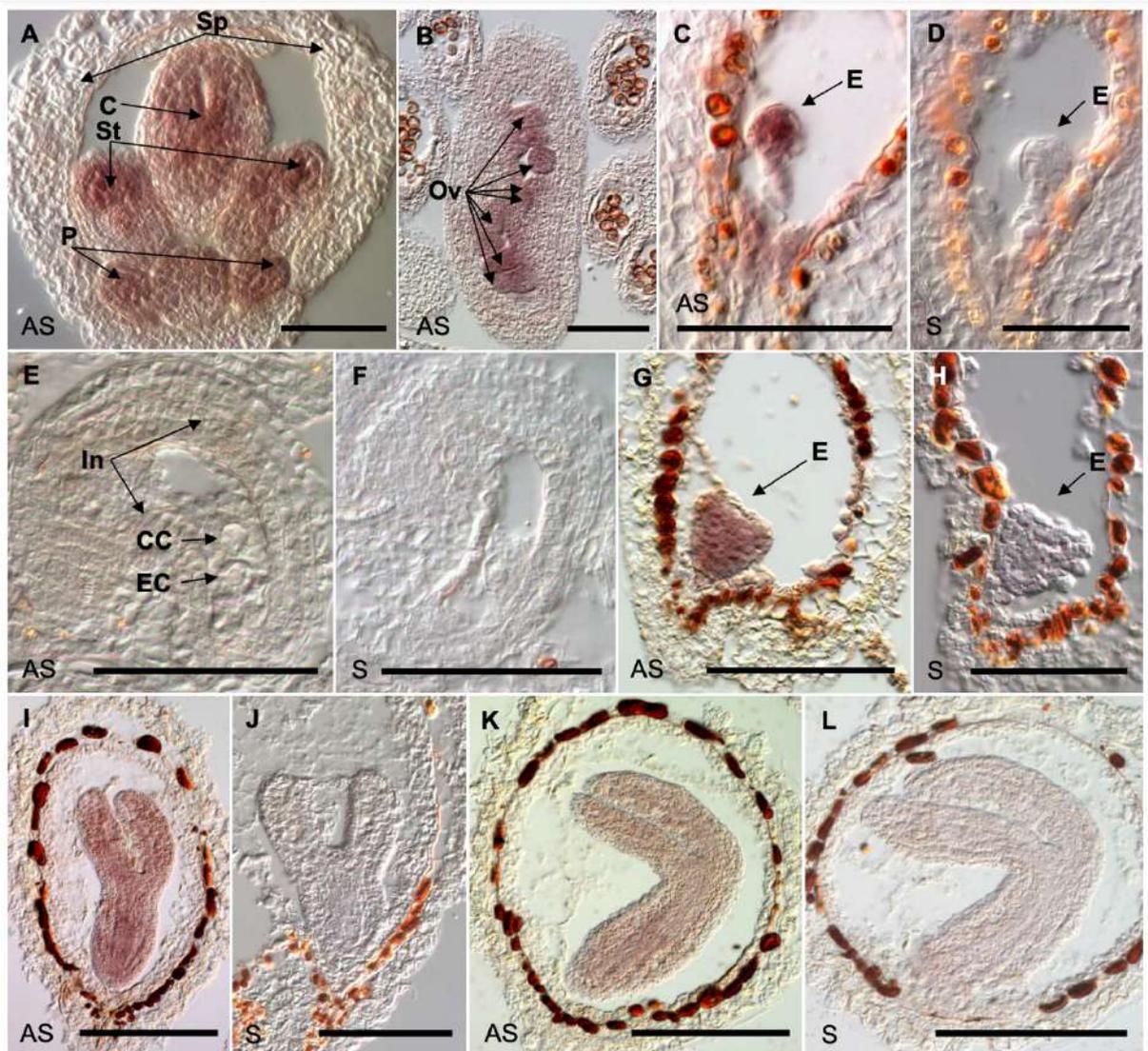


Рисунок 38 - Экспрессия гена *CULA* в тканях цветка и развивающихся семенах, проанализированная с помощью гибридизации *in situ*. (А) Продольный срез молодой цветочной почки. (В) Бутон цветка с примордием семязачатка. (С, D) Зародыш на глобулярной стадии. (Е, F) Зрелый зародышевый мешок. (G, H) Зародыш на сердцевидной стадии. (I, J) Зародыш на стадии торпеды. (K, L) Зародыш на стадии трости. AS - антисмысловой зонд; S - смысловой зонд; C - плодолистик; CC - центральная клетка; E - зародыш; EC - яйцеклетка; Ov - семязачатки; P - лепестки; Sp - чашелистики; St - тычинки. Масштабная линейка = 50 мкм. (Dumbliauskas et al., 2011).

4.6 Значение комплексов на основе *CUL4* для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*

4.6.1 У мутантов *cul4* теряется импринтирование экспрессии *MEA*

Как было доказано ранее, MSI1 является компонентом комплекса FIS-PRC2, который необходим для нормального формирования семян (Köhler et al., 2003). Однако MSI1 был также обнаружен в других белковых комплексах, потенциально влияющих на функции хроматина (Hennig et al., 2005). Таким образом, мы задались вопросом, влияет ли потеря активности *CUL4* и/или *DDB1* на функции PRC2 при репродукции растений. В отличие от мутанта *msi1*, стручки *cul4-1* не показали явного удлинения после эмаскуляции цветков (рис. 39 А). Тем не менее, мы наблюдали развитие автономного эндосперма в 16% (n = 229) и 3,6% (n = 224) случаев у гомозиготных мутантов *cul4-1* и гетерозиготных *cul4-2* соответственно (рис. 39 В). Как и ожидалось, в семязачатках дикого типа не наблюдалось дополнительных делений центральной клетки в отсутствие опыления (n = 71) (рис. 39 В). Таким образом, несмотря на более низкую пенетрантность, мутанты *cul4* разделяют фенотип класса *fis* по инициации эндосперма в отсутствие оплодотворения (Ohad et al., 1996; Chaudhury et al., 1997; Grossniklaus, Vielle-Calzada, 1998; Kiyosue et al., 1999; Köhler et al., 2003; Guitton et al., 2004; Dumbliauskas et al. 2011). Затем мы исследовали, влияют ли мутации гена *CUL4* на родительский импринтинг *MEA* и/или *PHE1*, двух генов, активность которых регулируется комплексом FIS-PRC2 (Köhler et al., 2003, 2005; Varoux et al., 2006; Gehring et al., 2006; Jullien et al., 2006). Для того, чтобы различить родительские аллели мы использовали полиморфизм последовательностей у разных линий арабидопсиса. Интересным фактом было то, что мы обнаружили экспрессию отцовской аллели *MEA* у мутанта *cul4-1* (рис. 40 А). Примечательно, что блокировка экспрессии отцовской аллели *MEA* в контрольном опыте не была полной, так как при использовании пыльцы экотипа Columbia (Col-0) наблюдалась слабая, но выявляемая экспрессия этого гена. Согласно литературным данным,

предыдущие генетические исследования предполагали, что Col-0 несет отцовский модификатор абортивности семян *mea* (Vielle-Calzada et al., 1999), что возможно приводит к слабой дерепрессии отцовской аллели *MEA*. Однако полная экспрессия отцовской аллели *MEA* наблюдалась только через 3 дня после опыления (ДПО) при использовании пыльцы мутантов *cul4-1* или *cul4-1 ddb1a*.

Для дальнейшего исследования потери блокировки отцовской аллели *MEA* у мутантов *cul4-1* или *cul4-1 ddb1a* мы осуществляли интрогрессию репортерного гена *YFP* в конструкторе *pMEA::MEA-YFP* (Wang et al, 2006a) в мутантные растения *cul4-1* и *cul4-2*. При опылении пыльцой растений экотипа Col-0, содержащей локус *pMEA::MEA-YFP*, с помощью конфокальной микроскопии мы наблюдали флуоресцентный сигнал в эндосперме примерно у половины семян (рис. 40 В; таблица 15). Этот результат не согласуется с полным подавлением отцовской аллели *MEA* у Col-0, но согласуется с нашими результатами с использованием полиморфизма последовательностей (см. выше). Сходный результат наблюдался и когда гипоморфный мутант *cul4-1* использовали в качестве женского растения и опыляли пыльцой дикого типа, несущей репортер *pMEA::MEA-YFP*. Однако, когда мы использовали пыльцу *cul4-2 pMEA::MEA-YFP* для оплодотворения растений дикого типа Col-0, в некоторых семенах мы наблюдали еще более сильный сигнал флуоресценции (рис. 40 В), что подтверждает предположение о реактивации отцовского гена репортера *pMEA::MEA-YFP*, полученного из пыльцы мутантных растений *cul4* (Dumbliauskas et al., 2011).

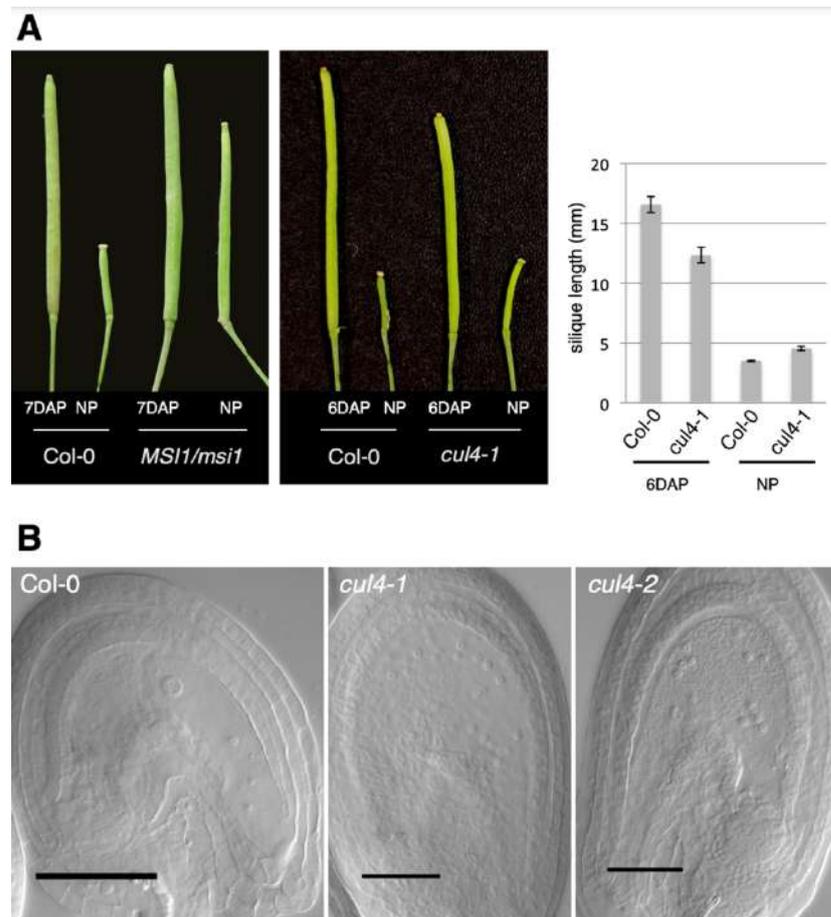


Рисунок 39 - Развитие автономного эндосперма у мутантов *cul4* и *msi1*.

(А) Характерные стручки растений дикого типа и мутантных растений. В то время как независимое от оплодотворения удлинение стручка отчетливо наблюдалось у гетерозиготных мутантных растений *msi1*, у мутанта с нокаутом аллели *cul4-1* этого не наблюдалось. Однако следует отметить, что удлинение стручка у мутанта *cul4-1* даже после оплодотворения было также слабым. Стручки наблюдались на 6 и 7 день после опыления (ДПО) или оставались неопыленными (NP). (В) Микроскопический анализ неоплодотворенных семязачатков через 5 дней после эмаскуляции. В гомозиготных *cul4-1* (средняя панель) и гетерозиготных *cul4-2* (правая панель) мутантнгов мы наблюдали семязачатки, инициирующие развитие семян. Тогда как в стручках растений дикого типа (левая панель) этого никогда не наблюдалось. Масштабная линейка = 50 мкм (Dumbliauskas et al., 2011).

Таблица 15 - Детекция сигнала MEA-YFP, экспрессируемой с отцовской аллели у мутантов дикого типа и *cul4*

Родительский генотип (женский × мужской)	Негативных	Позитивных (%)
Col-0 × Col-0 <i>MEA ::MEA-YFP</i>	14	15 (51.7%)
Col-0 × <i>cul4-2</i> <i>MEA ::MEA-YFP</i>	13	15 (54.6%)
<i>cul4-1</i> × Col-0 <i>MEA ::MEA-YFP</i>	13	14 (51.9%)
<i>cul4-1</i> × <i>cul4-2</i> <i>MEA ::MEA-YFP</i>	11	26 (70.2%)

Пытаясь уменьшить активность *CUL4*, мы объединили слабые аллели *cul4-1* с сильными аллелями *cul4-2*. Для этого гомозиготные женские растения *cul4-1* опыляли пыльцой гетерозиготных растений *cul4-2*. В потомстве ~50% семян останавливали свое развитие на поздней глобулярной стадии, что соответствовало фенотипу семян *cul4-1/cul4-2* гомозиготных растений. У этих семян недоразвитый ценоцитный эндосперм содержал крупные ядра (рис. 41) и дегенерировал на 4 ДПО. Интересно, что при опылении мутанта *cul4-1* пыльцой растений *cul4-2 pMEA::MEA-YFP* ~70% семян также обнаруживали флуоресцентный сигнал, (таблица 15). Сигнал был особенно сильным в aberrантном эндосперме остановивших свое развитие на 2 и 3 ДПО семян *cul4-1/cul4-2* (рис. 40 В).

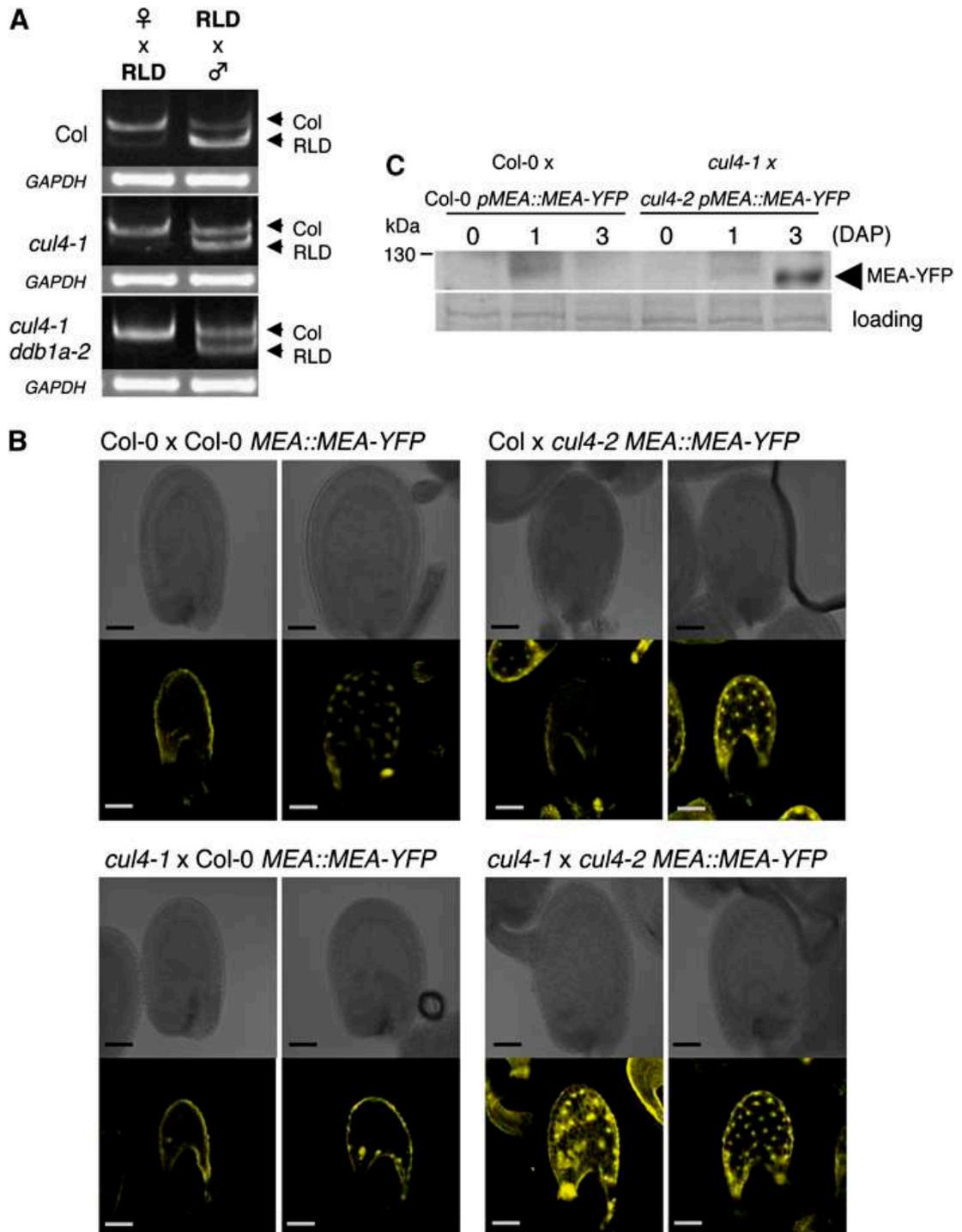


Рисунок 40 - Потеря родительского импринтинга гена *MEA* у мутантов *cul4*. (А) Анализ родительской аллель-специфичной экспрессии *MEA* в семенах дикого типа, *cul4-1* и *cul4-1 ddb1a-2* на 3 день после опыления (на 2 и 3 ДПО = DAP). Для экспрессии *MEA* экотип дикого типа Col-0 скрещивали с экотипом RLD. (В) Изображения, сделанные под конфокальным микроскопом и соответствующие им

изображения с DIC оптикой, демонстрирующие детекцию *pMEA::MEA-YFP* в различных скрещиваниях на 2 ДПО. Сильный флуоресцентный сигнал был обнаружен в аномально больших ядрах ценоцитного эндосперма, образовавшихся в результате скрещивания *cul4-1 cul4-2 pMEA::MEA-YFP*. Масштабная линейка=50 мкм. (С) Экспрессия белка MEA-YFP с отцовской аллели в двух разных скрещиваниях. Белковые экстракты анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антитела против GFP. Окрашивание кумасси синим использовали в качестве контроля загрузки (Dumbliauskas et al., 2011).



Рисунок 41 - Развитие зародыша и эндосперма в потомстве *cul4-1 x cul4-2*.

(А) Нормальное семя из того же стручка, что и семя, показанное на (В, С)

(В, С) Фенотип остановившегося глобулярного зародыша, наблюдаемый у ~ 50% семян в стручках *cul4-1*, используемых в качестве материнского растения и опыленных пыльцой *cul4-2*. Масштабная линейка = 20 мкм. Dumbliauskas et al. 2011.

Дополнительным подтверждением этого являлось накопление экспрессируемого с отцовской аллели белка MEA-YFP у гибрида от данного скрещивания, что было обнаружено вестерн-блоттингом (рис. 40 С). Таким образом, полученные нами результаты показывают, что *CUL4* необходим для поддержания репрессии отцовской аллели *MEA* (Dumbliauskas et al., 2011).

Поскольку комплекс PRC2 опосредует триметилирование остатка лизина 27 гистона H3 (H3K27me3) (Gehring et al, 2006; Jullien et al, 2006; Makarevich et al, 2006; Brukhin, Albertini, 2021), мы исследовали, влияет ли нокдаун *CULA* на метилирование гистонов. Анализ иммунопреципитации хроматина (ChIP), проведенный на молодых стручках, выявил снижение триметилирования H3K27 в локусе *MEA* (рис. 42 В). Примечательно, что аналогичный эффект не наблюдался при иммунопреципитации тканей молодых цветочных почек (рис. 42 А), что свидетельствует о том, что *CULA* участвует в поддержании, а не в установлении репрессивных меток гистонов.

В вегетативных тканях обе аллели *MEA* подавляются комплексами PRC2 благодаря появлению на хроматине меток H3K27me3 (Gehring et al, 2006; Jullien et al, 2006). Таким образом, мы выяснили, участвует ли *CULA* в подавлении экспрессии гена *MEA* на более поздних этапах развития. Как было показано, экспрессия *MEA* была обнаружена в гомозиготных растениях с нокдауном аллели *cul4-1*, хотя и в меньшей степени, чем у мутанта в гене, кодирующем белок CURLY LEAF (CLF) SET-домена, используемом в качестве контроля. Более того, ChIP анализ показал, что реактивация *MEA* коррелирует со снижением триметилирования H3K27 (Dumbliauskas et al., 2011).

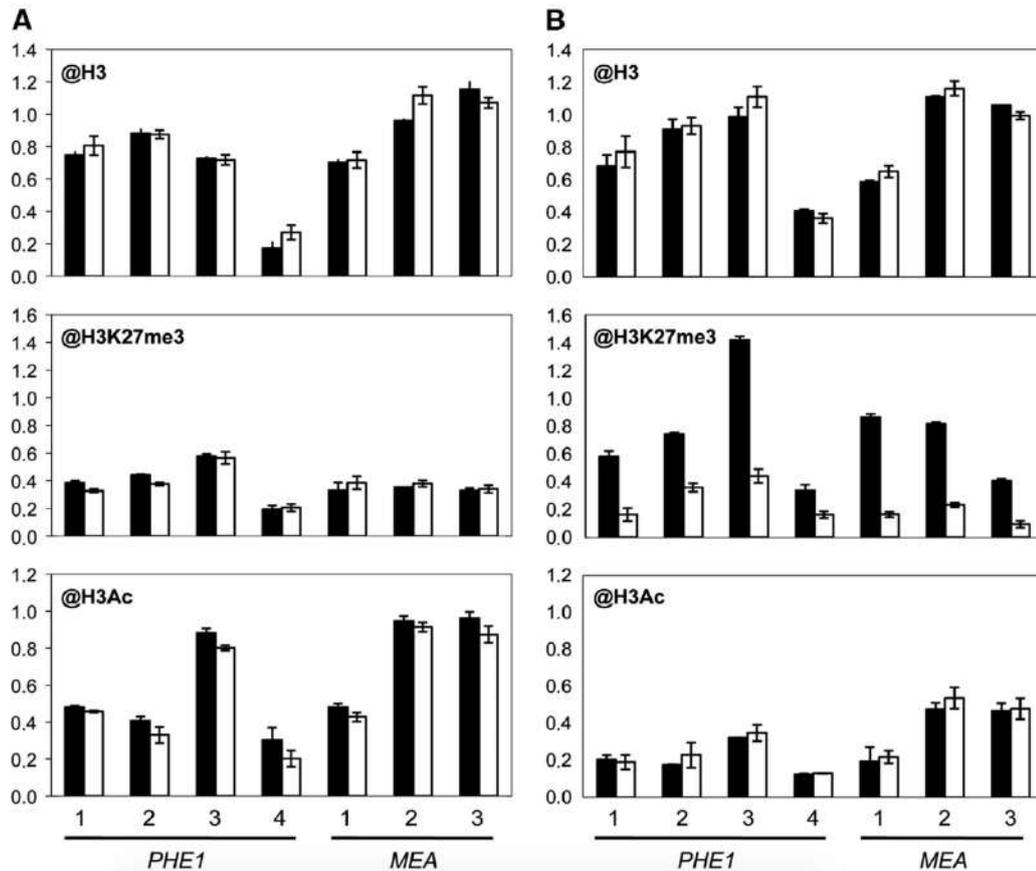


Рисунок 42 - Нокдаун гена *CUL4* индуцирует потерю репрессивной метки H3K27me3 как в локусах *MEA*, так и в локусах *PHE1* у молодых стручков. Относительные уровни модификаций гистонов хроматина *PHE1* и *MEA* исследовали после анализа ChIP с использованием антител против H3K27me3 и против H3ac. Хроматин Col-0 (черные столбцы) и гомозиготного мутанта *cul4-1* (белые столбцы) получали либо из закрытых цветочных почек до оплодотворения (A), либо из молодых стручков через 3–4 дня после опыления (B). Фрагменты ДНК после иммунопреципитации хроматина оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени, а затем нормализовали по внутреннему контролю. Показанные данные являются средним значением \pm стандартное отклонение трех технических повторов. Аналогичные результаты были получены в трех независимых экспериментах, DAP = ДАП. Dumbliauskas et al., 2011.

4.6.2 При дефиците *CUL4* в семенах накапливаются транскрипт и белок *МЕА*

Далее была исследована кинетика транскриптов *МЕА* и накопления белка, кодируемого этим геном. Растения Col-0, содержащие конструкт *pМЕА::МЕА-YFP*, самоопылялись, а уровни мРНК и белка *МЕА-YFP* в семенах определяли до и во время первых 3-х дней после опыления (ДАП). В то время как уровень мРНК *МЕА* после опыления постепенно снижался, белок *МЕА* быстро исчезал и почти не обнаруживался на 2-й ДАП (рис. 43 А). Таким образом, уровень белка *МЕА* очень динамичен и, по-видимому, он находится под контролем как транскрипции, так и посттранскрипционных событий. Чтобы проследить динамику этого белка, мы исследовали накопление белка *МЕА-YFP* в мутантных растениях *cul4*. Было обнаружено, что трансген *pМЕА::МЕА-YFP* подвергается частичному сайленсингу в растениях *cul4-2*, что, по крайней мере частично, может объяснить более низкое содержание белка *МЕА-YFP* у мутанта (рис. 43 В). Поскольку у мутанта *cul4-2* уровень транскрипции *МЕА* не уменьшался (рис. 43 В), по-видимому, накопление белка *МЕА-YFP* главным образом отражает транскрипционную регуляцию с помощью *CUL4*, хотя нельзя исключить и посттранскрипционную регуляцию. Наши результаты ясно демонстрируют, что активность *CUL4* необходима для ограничения экспрессии *МЕА* при развитии семян (Dumbliauskas et al., 2011).

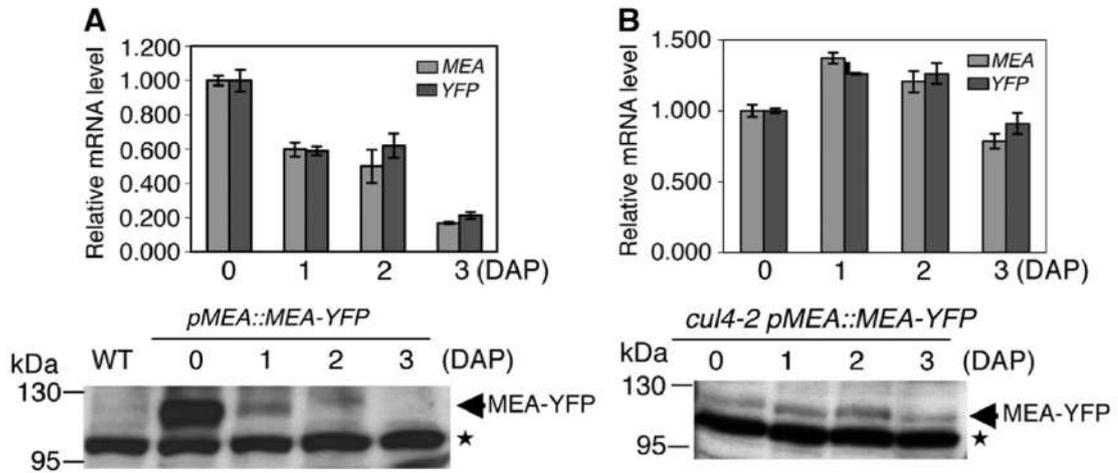


Рисунок 43 - Экспрессия *MEA* в развивающихся плодах растений дикого типа и у мутантов *cul4*. (А, В) Уровни мРНК и белка *MEA-YFP* в развивающихся плодах самоопыляющихся растениях Col-0 (А) и гетерозиготных мутантных растений *cul4-2* (В). Относительные уровни общих транскриптов *MEA* (светло-серые столбцы) и *MEA-YFP* (темные столбцы), определенные с помощью количественной ОТ-ПЦР, показаны на верхних панелях. Уровень транскрипта *MEA-YFP* был снижен на ~50% в *cul4-2* по сравнению с Col-0 при 0 DAP (не показано). Средние значения \pm стандартное отклонение. Уровни белка *MEA-YFP* показаны в нижней части; 40 мг экстрактов общего белка анализировали с помощью иммуоблоттинга с использованием антитела против GFP. DAP = ДАП. (Dumbliauskas et al., 2011).

4.7 Выводы

MSI1 хорошо изученный белок класса WD40, который выполняет несколько функций для контроля динамики хроматина и экспрессии генов (Hennig et al., 2005). В частности, MSI1 был идентифицирован как субъединица комплекса FIS-PRC2 (Köhler et al., 2003), который регулирует родительский импринтинг при развитии семян. Мы получили доказательства того, что комплекс CUL4-DDB1 физически ассоциируется с MSI1 и участвует в регуляции FIS-PRC2 у арабидопсиса. Однако, поскольку белок MSI1 связан с дополнительными

белковыми комплексами, такими как фактор сборки хроматина 1 (CAF-1) и комплексом белков, связанных с ретинобластомой (Exner et al., 2006; Jullien et al., 2008), мы не можем исключить возможность того, что CUL4–DDB1 действует на нескольких уровнях.

У цветковых растений импринтинг был изучен в основном на эндосперме, представляющем собой терминальную ткань, развивающуюся после оплодотворения центральной клетки (Grossniklaus, 2005; Feil, Berger, 2007; Köhler, Weinhofer-Molisch, 2010; Брюхин, 2017). К настоящему времени было обнаружено несколько генов, которые экспрессируются по материнской линии, но являются молчащими по отцовской линии, такие как *MEA*, *FIS2* и *FWA* (Vielle-Calzada et al., 1999; Kinoshita et al., 1999, 2004; Jullien et al., 2006). В частности, сайленсинг отцовской аллели *MEA* осуществляется действием комплекса FIS-PRC2, который опосредует триметилирование гистона H3 по остатку лизина 27 (H3K27me3) (Gehring et al., 2006; Jullien et al., 2006; Makarevich et al., 2006). Напротив, ген MADS-бокс *PHE1* преимущественно экспрессируется с отцовской аллели, в то время как материнская аллель подавляется (Köhler et al., 2005). Материнская аллель *PHE1* репрессируется за счет комбинированного действия FIS-PRC2, содержащего MEA, и неметилированного состояния ДНК в дифференциально метилированном регионе (DMR) в 3' области гена *PHE1* (Köhler et al., 2005; Makarevich et al., 2006). В спермиях DMR метилирование, скорее всего, поддерживается ДНК-метилтрансферазой (MET1), предотвращающей сайленсинг и вызывающей активацию отцовской аллели *PHE1* (Makarevich et al., 2008).

В соответствии с ролью CUL4-DDB1 в регуляции комплекса FIS-PRC2 мы смогли показать, что сниженная активность *CUL4* приводит к автономному делению ядер эндосперма, хотя и с более низкой пенетрантностью, чем у некоторых других мутантов класса *fis* (Ohad et al., 1996; Chaudhury et al., 1997; Köhler et al., 2003; Guitton et al., 2004). Однако процент семян с фенотипом *fis*, наблюдаемый у *cul4* (3,6–16%), довольно сходен с таковым у мутантов *mea* в диапазоне от 3 до 20% (Grossniklaus, Vielle-Calzada, 1998; Kiyosue et al., 1999). Для *mea* такая низкая пенетрантность может быть объяснена функциональной

избыточностью с ее паралогом *SWINGER* (Wang et al., 2006a). Более того, мы показали, что сайленсинг отцовской аллели *MEA* терялся, когда функция *CUL4* была ослаблена. Соответственно, количество репрессивных меток H3K27me3 было значительно снижено у мутанта с нокдауном аллели *cul4-1* (Dumbliauskas et al., 2011).

Результаты наших экспериментов указывают на то, что CUL4-DDB1 требуется не для установления сайленсинга отцовской аллели *MEA*, а скорее для его поддержания. Во-первых, мы никогда не наблюдали реактивацию отцовской аллели *MEA* в пыльце мутанта *cul4* или нулевых мутантов. Во-вторых, мы наблюдали сильную экспрессию отцовской аллели *MEA* только на 2-й–3-й день после опыления, но не на 1-й день. В-третьих, в экспериментах с иммуноприцепитацией хроматина (ChIP) не удалось выявить потерю меток H3K27me3 в локусе *MEA* в молодых цветочных почках, однако это было очевидным в молодых стручках, то есть только после оплодотворения. Наконец, мы также обнаружили, что *CUL4* участвует в поддержании репрессии *MEA* на более поздних стадиях развития (например, у 17-дневных растений), что зависит от другой формы комплекса PRC2, содержащей CLF, такой как гистонметилтрансфераза.

Несмотря на то, что CUL4-DDB1 участвует в функциях FIS-PRC2, мутации потери функции *CUL4* не фенотипируют все аспекты мутантов класса *fis*. В частности, у мутантов *cul4* мы не наблюдали столь сильной пенетрантности развития автономного эндосперма, как у мутантов *msi1* (Köhler et al, 2003; Guitton et al, 2004), а также наличия партеногенетических зародышей (Guitton, Berger, 2005; Dumbliauskas et al., 2011). Это может быть объяснено, по крайней мере, двумя особенностями, отличающими *cul4* от мутантов класса *fis*. Во-первых, предполагается, что CUL4 арабидопсиса также участвует в регуляции клеточного цикла (Marrocco et al., 2010; Roodbarkelari et al., 2010), как это было показано у многоклеточных животных (Jin et al., 2006; Abbas et al., 2008; Havens, Walter, 2009), то есть, вместо стимуляции клеточной пролиферации в эндосперме, как это наблюдается у мутантов класса *fis*, потеря *CUL4* ограничивает клеточное деление

в этой ткани, таким образом, противодействуя фенотипу *fis*. Во-вторых, нокдаун *cul4-1* не влияет на родительский импринтинг всех мишеней FIS-PRC2 (Dumbliauskas et al., 2011).

Уже отмечалось, что убиквитинирование связано с репрессией, опосредованной комплексом *Polycomb* (обзор Niessen et al., 2009). В частности, было показано, что комплекс PRC1 человека связан с активностью E3-лигазы в отношении гистона H2A (Wang et al., 2004), которая запускается двумя его субъединицами, RING1 и RNF2 (также называемыми RING1B или RING2) (de Napoles et al., 2004; Buchwald et al., 2006). В типичной модели PRC1 связывается с гистоном H3K27me₃, катализируя моноубиквитинирование гистона H2A, что, в свою очередь, может воздействовать на механизм транскрипции или на белки ремоделирования хроматина, тем самым подавляя транскрипцию генов-мишеней (Stock et al., 2007; Zhou et al., 2008). Более того, было показано, что строгий баланс между убиквитинированием и деубиквитинированием гистона H2A важен для *Polycomb*-опосредованной репрессии у дрозофилы (Scheuermann et al., 2010). Арабидопсис также содержит белки RING-домена, которые вместе с LHP1 могут выполнять PRC1-подобные функции (Xu, Shen, 2008), скорее всего, посредством убиквитинирования гистона H2A (Bratzel et al., 2010).

Полученные нами результаты того, что E3-лигаза CUL4-DDB1-MSI1 необходима для поддержания FIS-PRC2-зависимого родительского импринтинга у арабидопсиса, ставит вопрос, какой именно субстрат (субстраты) является мишенью для убиквитинирования в этом процессе. Одна из возможностей состоит в том, что CUL4-DDB1-MSI1 может убиквитинировать непосредственно одну из субъединиц FIS-PRC2.

Первоначально мы предположили, что MSI1 может быть либо субстратом, либо субстратным рецептором E3-лигазы, либо даже тем и другим. Поэтому мы осуществили интрогрессию репортерного гена *pMSI::MSI1-RFP* (Chen et al., 2008) в геном мутанта *cul4-1* и затем проверили накопление белка MSI1 в клетках мутанта. Однако, когда растения *cul4-1 pMSI::MSI1-RFP* подвергались самоопылению, уровень белка MSI1-RFP был лишь немного выше, чем у дикого

типа, что позволяет предположить, что оборот белка MSI1 не контролируется *CUL4*.

Напротив, мы заметили, что у мутантов *cul4* белок MEA не исчезает после опыления. Таким образом, можно предположить, что убиквитинирование контролирует его стабильность, хотя мы не можем исключить, что накопление этого белка в клетках является и результатом персистенции транскрипта MEA. Тем не менее, непредусмотренное накопление белка MEA может изменить активность FIS-PRC2, например, благодаря диссоциации некоторых его компонентов или ассоциированных белков. Это также может объяснить парадокс, почему в присутствии большего количества белка MEA теряется репрессия отцовской аллели *MEA* (Dumbliauskas et al., 2011).

Наконец, также возможно, что *CUL4-DDB1-MSI1* действует на уровне FIS-PRC2 по механизму, который не предполагает деградации белка. В этом отношении хорошо известно, что E3-лигазы *CUL4* запускают различные виды непротеолитических реакций убиквитинирования, включая сборку K63-связанных полиубиквитиновых цепей и моноубиквитилование. Подобным образом, в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов после УФ-повреждения E3-лигаза *CUL4-DDB1-DDB2* (*DDB2* являющаяся субстратным рецептором WD40) запускает непротеолитическое убиквитинирование XPC (группа комплементации пигментной ксеродермы C), что позволяет ему связываться с поврежденной ДНК (Sugasawa et al., 2005), где он индуцирует убиквитинирование гистонов, предположительно для модификации структуры хроматина в местах повреждений ДНК (Karetanaki et al., 2006; Wang et al., 2006b). Интересно, что *CUL4* делящихся дрожжей связывается с гистонметилтрансферазой *Clr4* и необходим для РНК-интерференционного образования гетерохроматина (Hong et al., 2005; Jia et al., 2005), хотя *CUL4*-опосредованные модификации, которые участвуют в этом процесс, остаются неизвестными. Будущие исследования позволят идентифицировать субстраты комплекса *CUL4-DDB1-MSI1* E3-лигаз и прояснить его функцию (функции) в PRC2-зависимой эпигенетической регуляции, прежде всего, репродукции и развития растений.

Глава 5. Нарушение функции экзосом способствует возникновению гаметофитного и эмбриолетального фенотипов и аномалий развития растений

Малые РНК играют незаменимую роль в репродукции растений, в том числе в формировании и спецификации женского гаметофита, роста яйцеклетки и ряда других жизненно важных процессов (Aslam et al., 2022, также будет рассмотрено в главе 7). При этом экзосомы играют центральную роль в метаболизме РНК. Экзосома является эволюционно консервативным макромолекулярным комплексом, который обеспечивает многочисленные реакции процессинга и деградации 30–50 н. РНК, этот комплекс необходим для поддержания жизнеспособности эукариот (Estevez et al., 2003; Mitchell et al., 1997). Потеря любой из субъединиц ее девятикомпонентного комплекса летальна для дрожжей *S. cerevisiae* и вызывает почти идентичные профили дефектов процессинга РНК (Allmang et al., 1999a, 1999b). Рентгеноструктурный анализ экзосомы человека показывает, что для ее целостности необходимы все девять основных субъединиц (Liu et al., 2006).

Отличительной особенностью корового комплекса экзосомы является наличие гексамерного кольца, определяемого гетеродимерами белков РНКазы с доменами РН-типа, RRP41-RRP45, MTR3-RRP42 и RRP43-RRP46. Эти гетеродимеры соединены, с одной стороны, тремя субъединицами, содержащими домены S1 и KH: RRP40 связывает RRP45 и RRP46, RRP4 взаимодействует с RRP41 и RRP42, а CSL4 связывает MTR3 и RRP43 (рис. 44; Pefanis, Basu, 2015). Все шесть РНКазных белков РН-типа в комплексах дрожжей и человека являются каталитически неактивными и служат для опосредованного взаимодействия с RRP44 (Dis3), 3'–5' гидролитическая РНКаза, ответственна за большую часть, если не за всю каталитическую активность экзосомы дрожжей. (Dziembowski et al., 2007; Liu et al., 2007). Напротив, субъединица экзосомы RRP41 у растений сохранила свою каталитическую способность (Chekanova et al., 2000). RRP44 стабильно связана с коровым комплексом у дрожжей и дрозофилы, но не у человека и *T. brucei*

(Chen et al., 2001b; Estevez et al., 2001, 2003). Эти наблюдения указывают на еще не изученное разнообразие структурно-функциональных взаимодействий в комплексе экзосом.

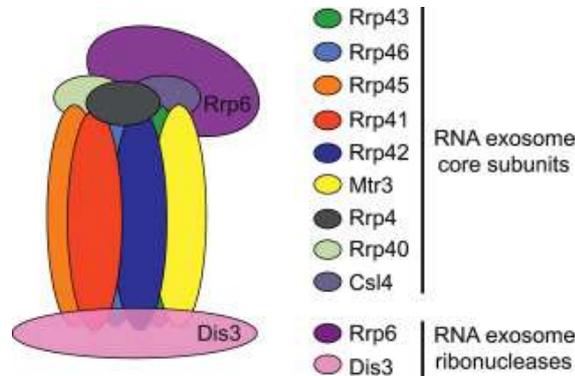


Рисунок 44 - Архитектура организации субъединиц в экзосомном комплексе РНК (Pefanis, Basu, 2015).

На работу экзосомы влияют множественные вспомогательные факторы, которые обеспечивают ее правильное функционирование. Основные функции экзосомы в цитоплазме, такие как гомеостатический оборот мРНК, распад нестабильных мРНК, нонсенс-опосредованный распад мРНК, а также деградация фрагментов мРНК, образовавшихся в результате эндонуклеолитического расщепления с помощью комплекса RISC или прекращение расщепления, опосредованы комплексом SKI2/SKI3/SKI8 и белком SKI7 (более подробно рассмотрено в Houseley et al., 2006). В ядре также имеются многочисленные мишени экзосомы. Ядерная экзосома удивительно универсальна и способна осуществлять точный процессинг 3'-концевого предшественника 5.8S рРНК (Allmang et al., 1999a), кроме того она полностью разрушает внешний транскрибируемый спейсер рРНК (Allmang et al., 2000), аберрантные пре-рРНК, пре-мРНК и пре-тРНК (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Kadaba et al., 2004, 2006; Libri et al., 2002; Torchet et al., 2002), а также обычные мРНК, задержавшиеся в ядре (Das et al., 2003). Данные функции процессинга и деградации требуют различных вспомогательных факторов: предполагаемый РНК-связывающий белок LRP1

участвует в процессинге стабильных РНК (Mitchell et al., 2003; Peng et al., 2003), тогда как РНКазы D-подобный белок RRP6 необходим для всех видов деятельности ядерной экзосомы. Кроме того, деградации ядерной РНК способствует комплекс TRAMP (полиаденилирование *TRF4/5-AIR1/2-MTR4*), который помогает привлекать экзосомы к различным абберрантным РНК (LaCava et al., 2005; Vanasova et al., 2005; Wyers et al., 2005).

Хотя экзосома расположена на стыке транзакций клеточной РНК, степень сохранения отношений структура-функция и роли ее индивидуальных субъединиц в филогенетическом спектре оставались неизвестными. Кроме того, выяснению механистической основы значимости экзосомы препятствует ее функциональная универсальность. Более того, еще предстоит всесторонне идентифицировать субстраты экзосомы в разных системах, поскольку даже самые обширные доступные наборы данных касаются только их ядерно-специфических функций либо основаны на платформах микрочипов, которые не охватывают весь геном (Davis, Ares, 2006; Houalla et al., 2006; Wyers et al., 2005). Мы представили некоторые доказательства уникальной субфункционализации отдельных коровых субъединиц экзосом растений, а также роли экзосом в контроле качества РНК у растений.

5.1 Состав внутреннего контура экзосомы *арабидопсиса*

Ранее было показано, что белки RRP4 и RRP41 *Arabidopsis thaliana* физически взаимодействуют и располагаются в высокомолекулярных комплексах растений (Chekanova et al., 2000, 2002). Чтобы выяснить их состав, мы создали трансгенные растения *rrp4-1* или *rrp41-1*, экспрессирующие ТАР-меченый RRP4 либо ТАР-меченый RRP41 в мутантных растениях *rrp4-1* или *rrp41-1* соответственно (Chekanova et al., 2007). Метод ТАР (тандемная аффинная очистка, англ. Tandem Affinity Purification) представляет собой метод аффинной очистки для выделения ТАР-меченых белков вместе с ассоциированными белками. Метка ТАР состоит из пептида, связывающего кальмодулин (СРВ), сайта расщепления

протеазой вируса табака (TEV) и белка А. TAP-меченые RRP4 и RRP41 полностью восстановили летальные фенотипы соответствующих им нулевых аллелей. TAP-меченые комплексы очищали, а полипептиды, общие для растений RRP4-TAP и RRP41-TAP, но отсутствующие в растениях дикого типа (WT), анализировали на масс спектрофотометре MALDI и MS/MS. Было идентифицировано девять полипептидов, соответствующих известным субъединицам коровой части экзосомы, субъединицам, содержащим домен S1 и/или KH: RRP4, RRP40A и CSL4, а также субъединицам РНКазы РН-типа RRP41, RRP42, RRP43, RRP45B, RRP46 и MTR3 (рисунок 45 и таблица 16).

Таблица 16 - масс-спектрометрическая (MS/MS) идентификация полипептидов субъединиц экзосом арабидопсиса

Белок	AGI ID	Линия RRP4-TAP		Линия RRP41-TAP	
		PMF показатель белка	Достоверность	PMF показатель белка	Достоверность
RRP4	At1g03360	156	100	330	100
RRP40A	At2g25355	134	100	400	100
CSL4	At5g38885	288	100	500	100
RRP41	At3g61620	62	100	106	100
RRP42	At3g07750	150	100	303	100
RRP43	At1g60080	43	86	148	100
RRP45B	At3g60500	56	99	87	100
RRP46	At3g46210	35 (ion score)	98	N/A	N/A
MTR3	At4g27490	66	100	46	93

(Chekanova et al., 2007)

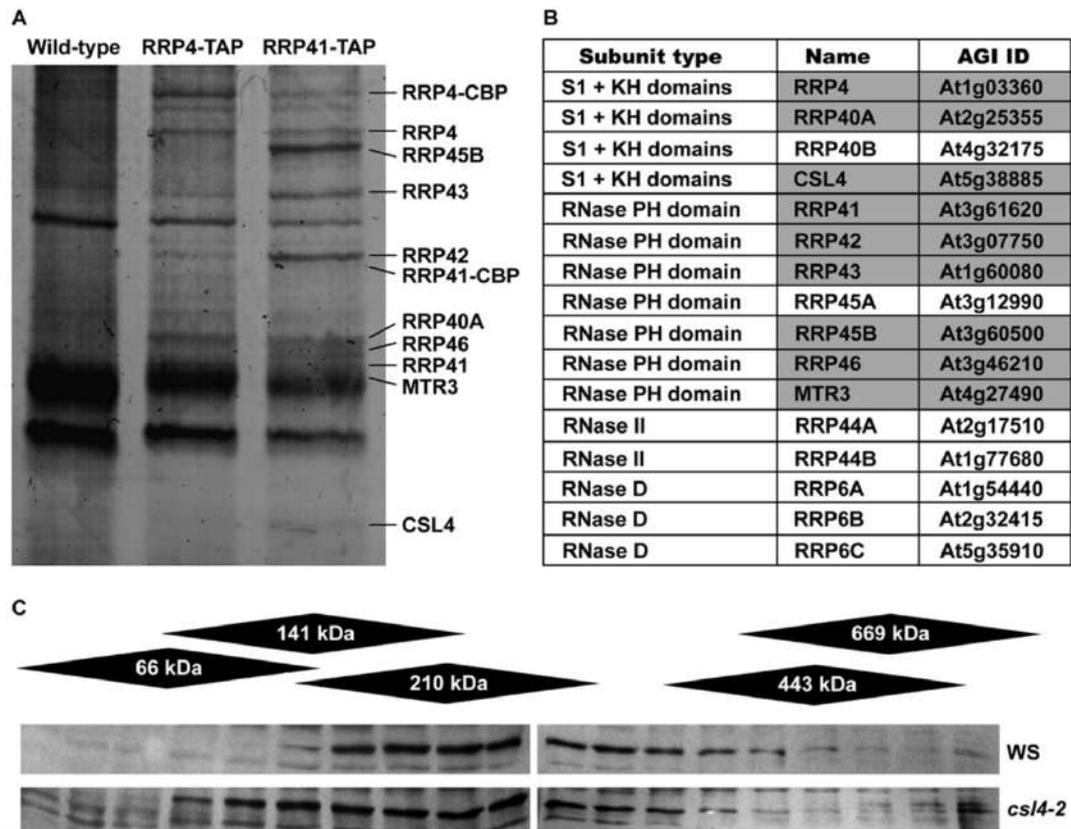


Рисунок 45 - Композиционный анализ экзосом арабидопсиса.

(А) меченные TAP белки на дорожках RRP4-TAP, RRP41-TAP и WT. Указаны субъединицы экзосом, идентифицированные с помощью MS/MS. Основные бэнды, общие для WT, RRP4-TAP и RRP41-TAP, соответствуют протеазе TEV и обычным примесям. (В) Гомологи субъединиц экзосомны, закодированные в геноме арабидопсиса; серым выделены субъединицы, которые были идентифицированы в препаратах, меченных TAP. (С) Совместное осаждение белка RRP41 арабидопсиса (27 кДа) с комплексом >210 кДа из экстрактов растений Ws и *csl4-2* (расчетная молекулярная масса экзосомы арабидопсиса, основанная на результатах MS/MS, составляет 274 кДа) (Chekanova et al., 2007).

Из субъединиц, кодируемых дублированными генами, были идентифицированы только RRP40A и RRP45B. Возможно это связано с различиями в паттернах экспрессии и/или уровнях экспрессии членов этих пар генов (Hooker et

al., 2007). RRP6, которая присутствует только в ядерной экзосоме (Allmang et al., 1999b; Brouwer et al., 2001; Graham et al., 2006) и, вероятно, была недостаточно представлена в наших препаратах, также отсутствовала. С другой стороны, отсутствие RRP44, ответственной за большую часть, если не за всю каталитическую активность коровой части экзосомы у дрожжей и человека, может отражать видоспецифичные различия в функциональной архитектуре экзосомы, поскольку субъединица RRP41 арабидопсиса уникальна тем, что сохраняет свою полную каталитическую активность (Chekanova et al., 2000).

5.2 Мутации в коровых субъединицах экзосом арабидопсиса вызывают уникальные фенотипы

Для изучения роли специфических компонентов экзосомы при размножении и развитии растений, а также последствий, возникающих при потере их функции, мы охарактеризовали инсерционные аллели Т-ДНК в генах, кодирующих несколько коровых субъединиц экзосомы арабидопсиса. Как уже упоминалось, субъединица CSL4 у дрожжей необходима для поддержания их жизнеспособности (Allmang et al., 1999b; Baker et al., 1998), а рентгеноструктурный анализ экзосомы человека показал, что все ее основные субъединицы имеют одинаково важное значение для поддержания структурной целостности и функциональности всего комплекса (Liu et al., 2006). В отличие от этого, мы обнаружили, что ни целостность, ни функция экзосомы у арабидопсиса не были значительно нарушены с потерей субъединицы CSL4. Это подтверждается тем, что, во-первых, ни *csl4-1*, ни *csl4-2* (подтвержденные нулевые аллели) мутантные растения не проявляли какого-либо заметного фенотипа, отличного от WT (рис. 46). Во-вторых, фракционирование по размеру показало, что комплекс экзосом арабидопсиса, лишенный CSL4, оставался почти неповрежденным (рис. 45С). Кроме того, анализ мозаичного микрочипа (англ. tiling microarray) показал, что потеря CSL4 влияет только на часть мишеней экзосомы (рис. 47). Напротив, субъединица RRP41 арабидопсиса была необходима для нормального развития женского гаметофита.

Мы обнаружили, что мутантная аллель *rrp41-1* обычно передавалась только по мужской родительской линии, но не по женской ($n = 194$), а самоопыляющиеся гетерозиготы *rrp41/RRP41* продуцировали как нормальные семена, так и abortированные семязачатки в соотношении 1:1 (рис. 48 А и 49; три независимые аллели *rrp41* показали идентичные фенотипы). Кроме того, полученное потомство расщеплялось в соотношении 1:1 - дикий тип (WT) к гетерозиготным растениям. Женские гаметофиты мутантных растений останавливали свое развитие ($n = 422$) в основном после первого митоза на двухъядерной стадии 43,1% (рис. 48 В и 48 С), реже на одноядерной (1,4%), четырехъядерной (3,3%) и на более поздних стадиях (3,0%).

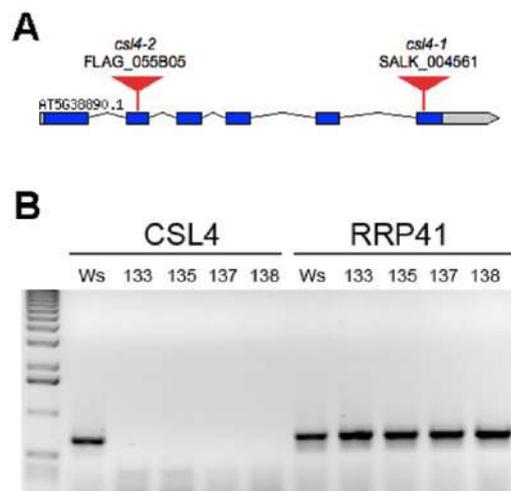


Рисунок 46 - Характеристика мутантных аллелей *csI4* арабидопсиса.

(А) Положения инсерций Т-ДНК относительно структуры гена *CSL4* в мутантных аллелях *csI4-1* и *csI4-2* (Т-ДНК обозначены красным, экзоны *CSL4* показаны синим цветом, а UTR отмечены серым цветом). (В) Эксперимент ОТ-ПЦР, демонстрирующий полное отсутствие мРНК *CSL4* в мутантных растениях *csI4-2* (показаны данные для четырех растений *csI4-2*, №133, 135, 137 и 138). В качестве положительного контроля использовали амплификацию мРНК *RRP41* с помощью ОТ-ПЦР из тех же растений (Chekanova et al., 2007).

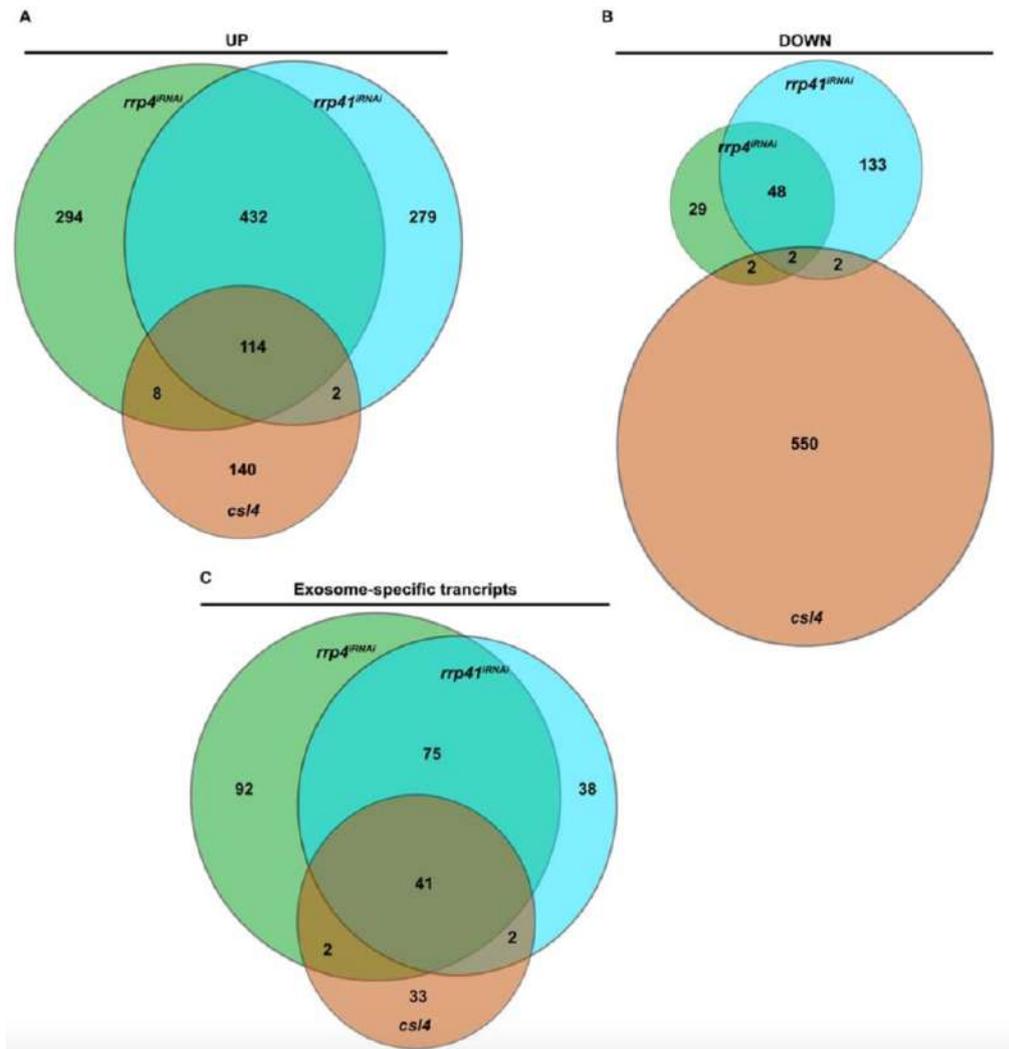


Рисунок 47 - Изменения экспрессии транскрипта в мутантных проростках *cs/4-2*.

На диаграмме Венна представлены положительные и отрицательные изменения в транскрипте арабидопсиса в ответ на инактивацию гена, кодирующего субъединицу CSL4 экзосомы по сравнению с изменениями, наблюдаемыми при сайленсинге *RRP4* (*rrp4^{iRNAi}*) или *RRP41* (*rrp41^{iRNAi}*). Проростки мутанта *cs/4-2* (в бэкграунде экотипа *Ws*, соответствующего генотипу контрольных растений (WT)) использовали для экстракции РНК на той же стадии развития, что и для анализа сайленсинга *RRP4* (*rrp4^{iRNAi}*) и *RRP41* (*rrp41^{iRNAi}*). (А) Изменения, связанные повышением экспрессии генов в проростках *cs/4-2*, идентифицированные с использованием строгих настроек TileMap (3 зонда с максимальным разрывом в

100 оснований и апостериорной вероятностью 0,7), демонстрируют довольно значительное перекрытие генов с повышением экспрессии, наблюдаемое при сайленсинге *RRP4* и *RRP41*. (B) С другой стороны, изменения с понижением экспрессии генов в проростках *cs14-2* гораздо более обширны, чем при сайленсинге *RRP4* и *RRP41*, более того, они существенно не перекрываются с генами изменившими экспрессию, наблюдаемыми в проростках *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*. (C) Важно отметить, что степень перекрытия между популяциями, специфичными для транскриптов экзосом (т. е. при которых РНК, которые невозможно обнаружить, если экзосомная активность не нарушена), которые активируются в мутантах *cs14-2* по сравнению с проростками *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*, очень значительна. (Chekanova et al., 2007).

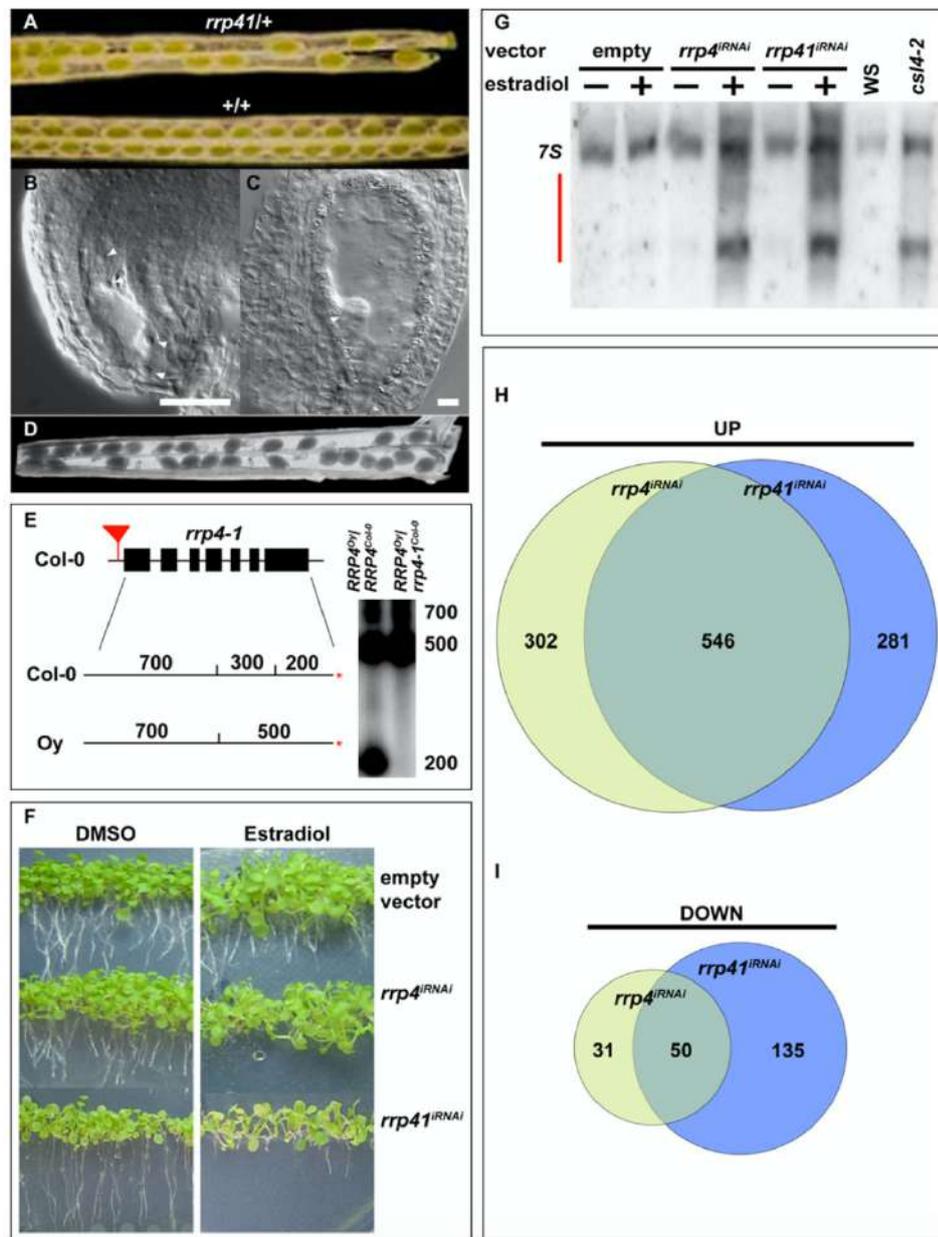


Рисунок 48 - Характеристика мутантных аллелей экзосомы.

(A–C) (A) Полустерильность; (B) терминальная остановка развития женских гаметофитов *rrp41-1* на четырехъядерной стадии, ядра указаны стрелками; (C) WT семя в том же стручке, что и женский гаметофит, показанный на (B), в котором гаметофит успешно завершил развитие, претерпел оплодотворение и зародыш достиг стадии октанта (стрелка указывает на зародыш в стадии октанта). Масштабная линейка = 50 мкм.

(D и E) Эмбрио-летальный фенотип у мутанта *rrp4-1*. (D) Гетерозиготы *RRP4/rrp4-1* образуют нормальные и абортированные семена в соотношении 3:1. (E) Аллели

Оу и Col-0 экспрессируются в гибриде WT Col-0/Оу F1, но специфический для Col-0 SNP не обнаруживается в *rrp4-1*^{Col-0}/Оу F1. Дистальный праймер для ПЦР был помечен ³²P (звездочка), а продукты ОТ-ПЦР расщеплялись с помощью *HpaII*. Аллель *rrp4-1* изображена схематично, размеры фрагментов *HpaII* указаны (в п. н.). (F и G) Иницируемая эстрадиолом индуцируемая РНКи из RRP4 и RRP41 в проростках приводит к остановке роста (F), сопровождаемой характерным дефектом процессинга предшественника 7S рРНК в зрелую 5.8S рРНК (G, вертикальная черта). (H и I) Изображение на диаграмме Венна изменений увеличения и уменьшения в транскриптоме арабидопсиса в ответ на сайленсинг *RRP4* и *RRP41* с помощью иРНКи. (Chekanova et al., 2007).

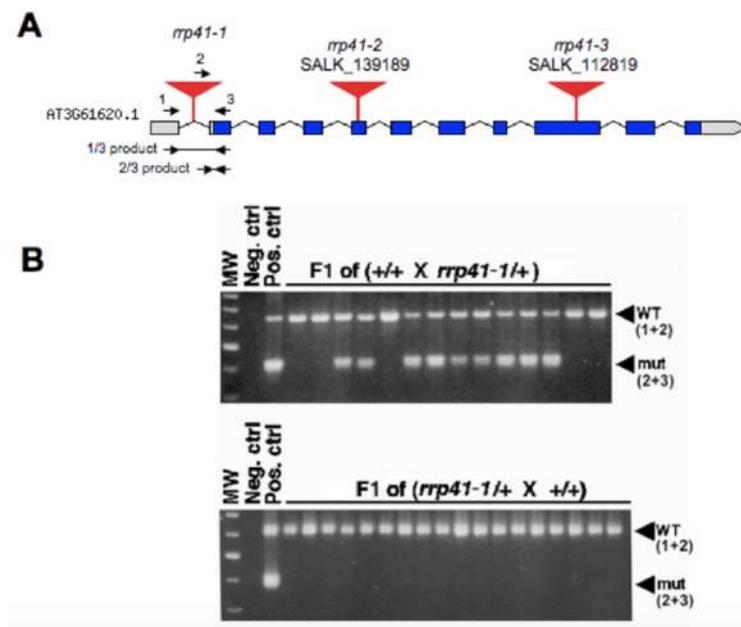


Рисунок 49 - Мутантные аллели *rrp41* арабидопсиса и их передача при реципрокных скрещиваниях.

(A) Положения вставок T-ДНК у мутантов *rrp41-1*, *-2* и *-3*. Расположение праймеров ПЦР, используемых для проверки передачи WT и мутантной аллели *rrp41-1*, показанных на (B). (B) Мультиплексная ПЦР для одновременного обнаружения как WT, так и мутантной аллели *rrp41-1* показывает, что аллель *rrp41-1* нормально передается по мужской линии (вверху), но не передается по материнской линии (внизу). Продукты ПЦР, специфичные для мутантных аллелей

WT и *rrp4-1*, и соответствующие пары праймеров указаны справа. (Chekanova et al., 2007).

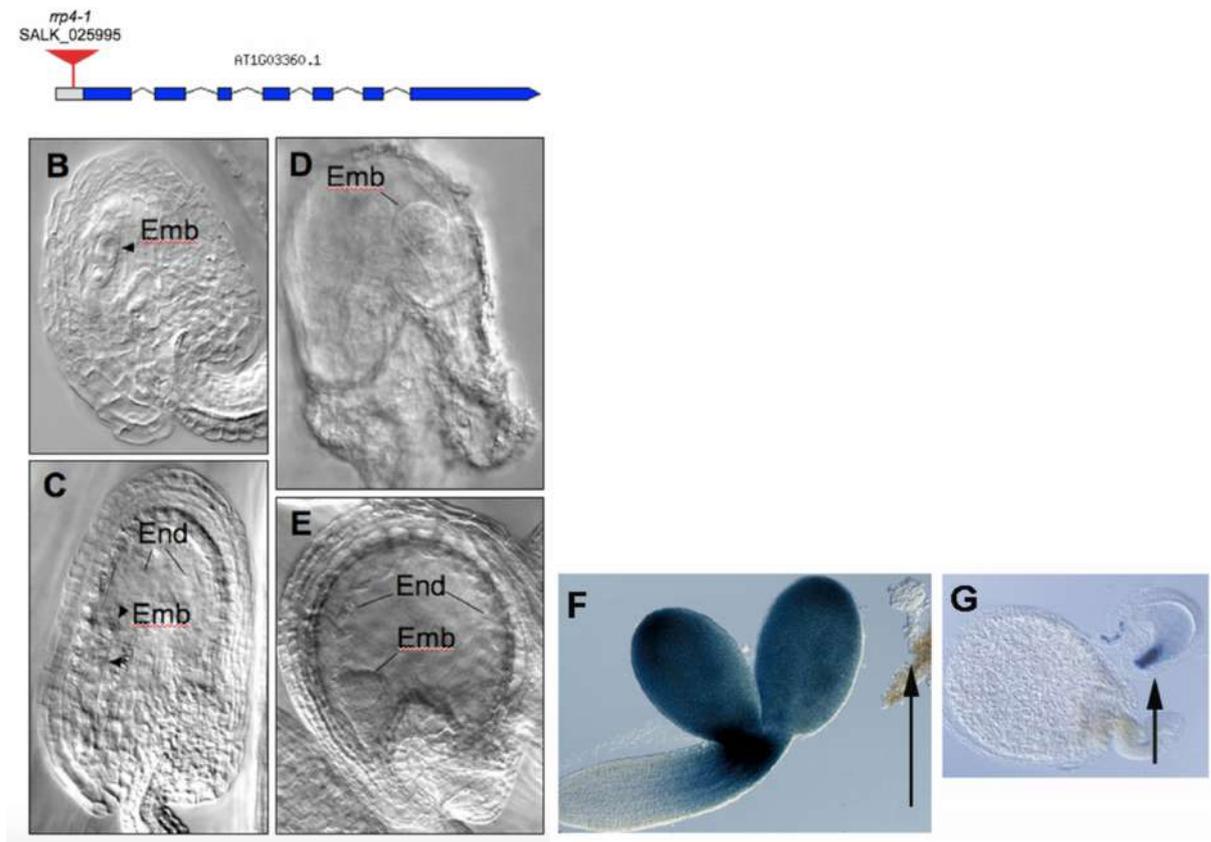


Рисунок 50 - Характеристика мутантной аллели *rrp4-1* и ассоциированного с ней фенотипа.

(А) Положение инсерции Т-ДНК в мутанте *rrp4-1*.

(В-Е) Диапазон фенотипов, наблюдаемых в семенах мутанта *rrp4-1*. Панели (В)-(D) представляют фенотип мутантных семян, а панель (Е) представляет семена WT из того же стручка, полученного путем самоопыления гетерозиготы *RRP4/rrp4-1*. Микроскопическое наблюдение просветленных препаратов семян. (В) Остановившееся в развитии семя, содержащее аномальный двухклеточный зародыш (отмечено стрелкой), эндосперм отсутствует; (С) Отстающее в развитии семя с аномальным двухклеточным зародышем (стрелки) и, по-видимому, нормально развивающимся эндоспермом (End); (D) Остановившее развитие семя с аномальным глобулярным зародышем (Emb), эндосперм отсутствует; (Е) Нормально развивающееся семя WT с ранним сердцевидным зародышем (Emb)

и альвеолярным эндоспермом (End) из того же стручка, что и остановившие развитие семена, показанные на панелях (B–D). (F, G) Характеристика стадии остановки развития мутантных семян *rrp4-1* с использованием репортерных трансгенов. (F) Трансген *FAE1::GUS* (Rossak et al., 2001) экспрессируется в почти зрелом зародыше WT, но не в мутантном глобулярном зародыше *rrp4-1* (стрелка), оба семени из одного и того же стручка, который был получен в результате самоопыления гетерозиготы *RRP4/rrp4-1*. (G) Трансген *DCL1::GUS* (Golden et al., 2002), который выключен в семенах WT на глобулярной стадии, однако все еще экспрессируется в мутантном зародыше *rrp4-1* (стрелка), семена получены из одного и того же стручка, образовавшегося в результате самоопыления гетерозиготы *RRP4/rrp4-1* (Chekanova et al., 2007).

Наконец, потеря RRP4 являлась причиной еще одного фенотипа, а именно, семена мутанта *rrp4-1* прекращали развитие на ранних стадиях эмбриогенеза (рис. 48 D и 50A – 50E). К тому времени, когда семена WT-потомства растений *rrp4-1/RRP4* достигали сердечковидной стадии эмбриогенеза или стадии торпеды, 30% семян потомства *rrp4-1/rrp4-1* содержали двухклеточные зародыши, 0,5% - неразделившиеся зиготы и 3% семян содержали зародыши на ранней глобулярной стадии (n = 393). Анализ стадийной специфики маркеров подтвердил, что морфология семян *rrp4-1* точно отражает сроки их развития (рис. 50 F и 50 G). Эндосперм мутантных семян *rrp4-1* формировался до разных стадий развития, но никогда не достигал стадии целлюляризации (рис. 50B – 50D). Наблюдаемые фенотипы были взаимосвязаны с нарушением исследуемого гена с помощью T-ДНК, которое было подтверждено использованием анализа на основе однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (рис. 48 E), эти фенотипы полностью восстанавливались с помощью дикой аллели (WT) и трансгенов *RRP4*, меченных TAP. В свете известных данных о том, что потеря комплекса декапирования мРНК арабидопсиса приводит к гибели проростков (Goeres et al., 2007; Xu et al., 2006), фенотип мутантных семян *rrp4-1* указывает на более общую функцию *RRP4* в постзиготическом развитии, что согласуется с широким диапазоном ее субстратов,

выявленных при анализе мозаичных микрочипов (Chekanova et al., 2007). Таким образом, своеобразие фенотипов мутантных растений *cs14*, *rrp4* и *rrp41* и ассоциированные с ними молекулярные сигнатуры (Chekanova et al., 2007) указывают на то, что отдельные субъединицы коровой части экзосомы арабидопсиса вносят неравный вклад в ее целостность и функционирование. Полученные нами результаты указывают на серьезные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до сих пор экзосомных комплексов в других системах.

5.3 Глобальный анализ мишеней экзосом арабидопсиса высокого разрешения

Для выяснения функции RRP4 и RRP41 во время вегетативного роста, мы разработали систему иРНК-индуцируемой эстрадиолом (иРНКи, англ. iRNAi - estradiol-inducible RNAi) (см. Экспериментальные процедуры). Выращивание трансгенных растений на среде, содержащей эстрадиол, индуцировало РНКи-опосредованный нокдаун мРНК *RRP4* (*rrp4iRNAi*) или *RRP41* (*rrp41iRNAi*), что приводило к остановке роста (рис. 48F) и последующей гибели проростков. Важно отметить, что остановке предшествовало накопление 3'недопроцессированной 5.8S рРНК (рис. 48G). Этот молекулярный фенотип указывает на нарушение функции экзосомы (Mitchell et al., 1997) и никогда не наблюдался у растений дикого типа, подвергшихся воздействию эстрадиола (как и ингибирование роста). Данные результаты показывают, что RRP4 и RRP41 арабидопсиса необходимы для постэмбрионального роста, и подтверждают, что условная система нокдауна иРНКи может быть полезной для исследования их функций *in vivo*, особенно для изучения постэмбриональной функции генов, мутации и нарушения работы которых вызывают гаметофитные или эмбриолетальные фенотипы, и тем самым не позволяют получить мутантные по этим генам растения.

Для всесторонней идентификации экзосомных мишеней у арабидопсиса и получения дополнительного представления об очевидной субфункционализации ее основных субъединиц, мы использовали метод иРНКи в сочетании с

полногеномными мозаичными микрочипами (tiling microarrays). Для сведения к минимуму изменений в экспрессии генов, которые не являются прямым результатом нокдауна экзосом, мы выбрали самую раннюю временную точку обработки эстрадиолом, соответствующую накоплению недопроцессированных типов 5.8S рРНК, но до задержки роста. Олиго(dT)-праймированные мишени, приготовленные из образцов РНК растений, содержащих пустой вектор, конструкции *rrp4^{iRNAi}* или *rrp41^{iRNAi}*, выращенные с эстрадиолом или без него, использовали для проверки сигналов на микрочипах. Следовательно, сигналы микрочипа должны соответствовать исключительно полиаденилированной РНК. Кроме того, чтобы исключить возможность ложных событий внутреннего праймирования, мы использовали быструю амплификацию 3'-концов кДНК (3'-RACE) для картирования сайтов полиаденилирования в субпопуляции мишеней, а также сравнивали относительное изменение экспрессии между фракциями поли(А)⁺ и тотальной РНК для выбранных мишеней (рис. 51 С) (Chekanova et al., 2007).

Применялся алгоритм TileMap, который базируется на скрытой марковской модели, основанной на t-статистике на уровне зонда (Ji, Wong, 2005), для идентификации геномных областей, демонстрирующих статистически значимые изменения. Данные об экспрессии массивов, гибридизовавшихся с мишенями растений *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*, обработанных эстрадиолом, сравнивали с соответствующими растениями, обработанными ДМСО, а также с растениями, трансформированными пустым вектором и обработанными эстрадиолом, в качестве негативного контроля. В общей сложности было идентифицировано 1612 геномных областей, демонстрирующих повышенные уровни полиаденилированной РНК при нокдауне *RRP4* (*rrp4^{iRNAi}*) и *RRP41* (*rrp41^{iRNAi}*) в то время, как понижение уровня экспрессии обнаруживала только около 1/10 от этого количества областей (рис. 48H и 48I). Истощение экзорибонуклеолитического комплекса должно вызывать повышение накопления его РНК-мишеней, поэтому подавляющее большинство изменений экспрессии в проростках при нокдауне *RRP4* и *RRP41*, скорее всего, является прямым эффектом этого истощения.

Напротив, аналогичный сравнительный анализ мутанта *cs14-2* с растениями дикого типа (экотип Ws) обнаружил, что активация не была преобладающей тенденцией (рис. 47). Таким образом, конститутивное отсутствие CSL4, вероятно, приводит ко многим вторичным эффектам. Данное наблюдение указывает на общую проблему при исследовании транскриптома с использованием конститутивных мутантов с потерей функции и, наоборот, подчеркивает ценность временных условных аллелей, таких как *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*. В то же время примечательно, что наблюдалось значительное перекрытие мишеней с повышенной экспрессией РНК между образцами *cs14-2*, *rrp4^{iRNAi}* и *rrp4^{iRNAi}*, в то время как перекрытие в спектрах РНК с пониженной экспрессией было незначительным (рис. 47). Следовательно, большинство РНК-мишеней с повышенной экспрессией, обнаруженных в проростках *cs14-2* составляют прямую молекулярную сигнатуру экзосомы без CSL4. Примечательно, что многие экзосомные мишени, экспрессия которых активировалась в образцах *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*, не были обнаружены у проростков *cs14-2*, включая те, которые ограничены ядром (например, предшественники микроРНК), а также цитоплазматические РНК (например, сплайсированные мРНК). Следовательно, экзосома, не содержащая CSL4, полностью активна для некоторых субстратов экзосомы как в цитоплазме, так и в ядре. Кроме того, эти данные представляют собой ценный ресурс для сужения поиска экзосомных мишеней, необходимых для жизнеспособности организма, путем вычитания набора данных по транскриптам с повышенной регуляцией *cs14-2* из анализа транскриптов у *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*. Например, дефект процессинга пре-рРНК 7S у мутантных проростков *cs14-2* был таким же значительным, как и у проростков, с недостатком RRP4 и RRP41 (рис. 48G), и все же мутантные растения *cs14-2* были фенотипически неотличимы от WT. Общий сравнительный обзор сходства и различия в изменениях экспрессии между мутантными линиями *cs14-2*, *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}* можно найти на рисунке 47, а также на соответствующем веб-сайте <http://signal.salk.edu/cgi-bin/exosome> (Chekanova et al., 2007).

С помощью анализа транскриптов, полученных из мутантных растений *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}* на мозаичном микрочипе были определены следующие основные классы прямых мишеней экзосом арабидопсиса: (1) малые ядерные РНК (мяРНК; 9 генов мяРНК как из *rrp4^{iRNAi}*, так и из *rrp41^{iRNAi}*; таб. 17); (2) большинство малых ядрышковых РНК (мякРНК), закодированных в геноме (83 и 96 генов мякРНК из образцов *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}* соответственно); (3) небольшая субпопуляция генов тРНК (20 и 14 соответственно; таб. 18); (4) субпопуляция мРНК арабидопсиса с повышенной экспрессией (205 и 266 мРНК соответственно); (5) субпопуляция мРНК, которые выходили за пределы их аннотированного 3' конца, что указывает на дефекты процессинга 3' конца (29 как из *rrp4^{iRNAi}*, так и из *rrp41^{iRNAi}*; таб. 19); (6) несколько специфических генов прай-миРНК (12 из *rrp4^{iRNAi}*, и 11 из *rrp41^{iRNAi}*; таб. 20); (7) большой класс ранее не охарактеризованных некодирующих РНК (нкРНК); многие из этих нкРНК перекрываются с повторяющимися элементами и локусами, генерирующими малые РНК (210 и 156 нкРНК соответственно); и (8) отдельный класс ранее не обнаруженных полиаденилированных транскриптов, которые картируются исключительно на 5' концы известных белок-кодирующих мРНК и, следовательно, могут обладать регуляторным потенциалом (52 как из *rrp4^{iRNAi}*, так и из *rrp41^{iRNAi}*). Примечательно, что в то время, как степень перекрывания спектров РНК-мишеней с положительной регуляцией, выявленная сайленсингом *RRP4* и *RRP41*, была довольно значительной (64%), оставшиеся различия между ними подтверждают представление о субфункционализации коровых субъединиц экзосомы у арабидопсиса. Таким образом, полученные результаты описывают сложный спектр экзосомных мишеней арабидопсиса, который охватывает транскрипты РНК полимераз I, II, III и, возможно, РНК полимеразу IV и включает ограниченные ядром РНК (например, при-миРНК), цитоплазматические РНК (например, сплайсированные мРНК), а также РНК, распределенные между двумя компартментами (Chekanova et al. 2007).

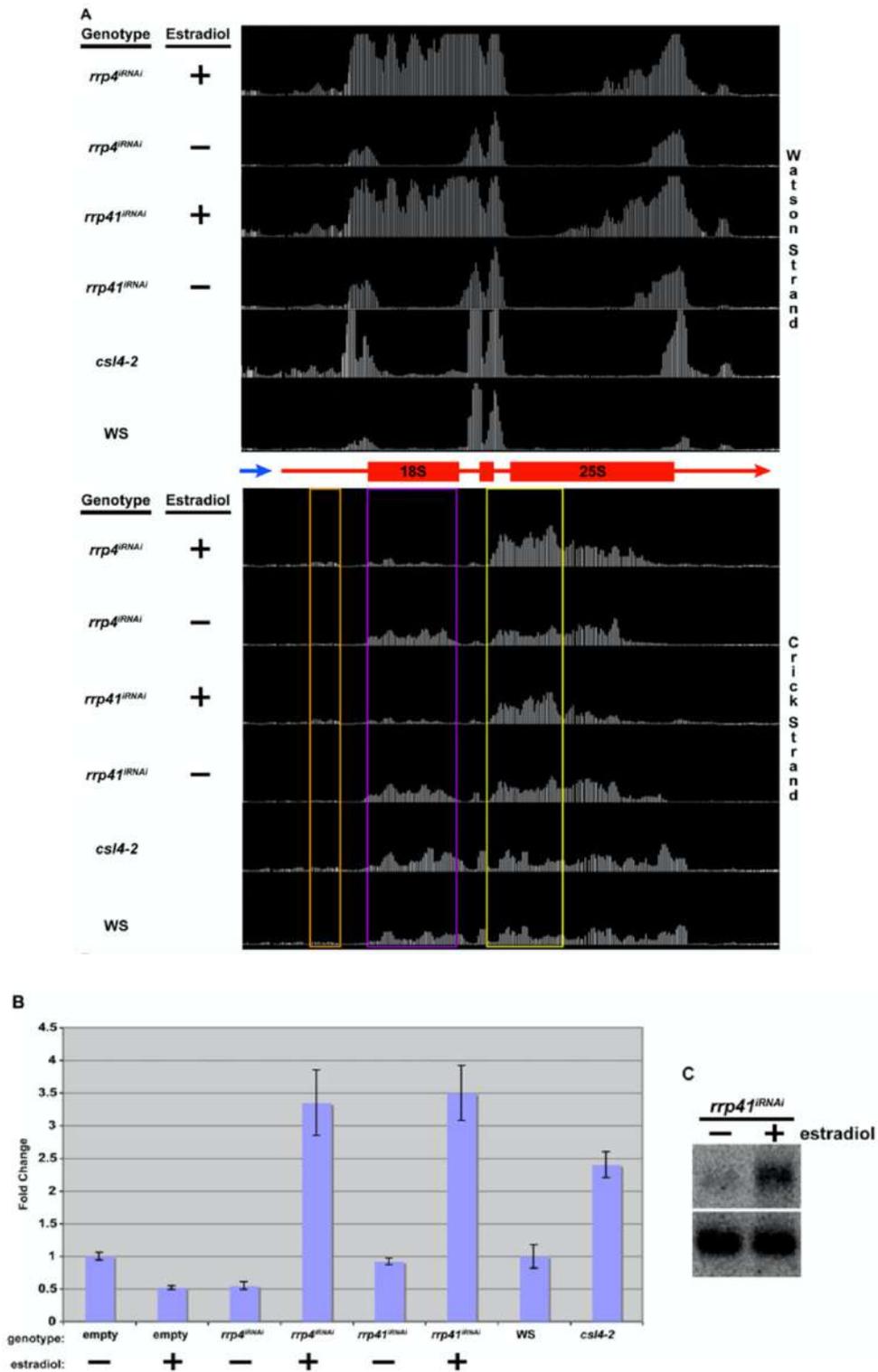


Рисунок 51 - Влияние сайленсинга или мутации субъединиц экзосом арабидопсиса на процессинг рРНК.

(А) Воздействие на виды, родственные смысловой (цепь Уотсона) и антисмысловой (цепь Крика) рРНК. Вертикальные полосы соответствуют зондам микрочипа. Прямоугольники ограничивают границы областей, демонстрирующих

заметные изменения, связанные с увеличением (оранжевый и желтый) и уменьшением (фиолетовый) транскриптов, ассоциированных с антисмысловой рРНК. (В) Валидация с помощью ОТ кПЦР положительной регуляции транскрипта IGS (синяя стрелка в А; планки погрешностей, \pm стандартное отклонение). (С) Нозерн-анализ поли(А)+ (вверху) и общей РНК (внизу) с использованием того же зонда, что и на рисунке 48 G, показывает накопление предшественника полиаденилированной рРНК длиной 2,4 тыс. п.н. (Chekanova et al. 2007).

Таблица 17 - Гены мяРНК арабидопсиса, активирующиеся при истощении ЭКЗОСОМ.

<i>rrp4est</i>		<i>rrp41est</i>		<i>csi4-2</i>	
AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID	Области повышенной экспрессии при мутации <i>csi4</i>
At1g08115	2538092-2538185	At1g61275	22606817-22606965	At1g08115	2538128-2538234
At1g61275	22606817-22606965	At3g06900	2178169-2178305	At3g06895	2178280-2178336
At3g13855	4561098-4561171	At3g13855	4561098-4561171	At3g56705	21015511-21015548
At3g14735	4951576-4951656	At3g14735	4951541-4951656	At3g56705	21015603-21015637
At5g09585	2975119-2975154	At5g09585	2975119-2975154	At3g57645	21357869-21357869
At5g27720	9816553-9816696	At5g27720	9816553-9816734	At3g57645	21357875-21357892
At5g46315	18804588-18804790	At5g40395	16183314-16183489	At5g40395	16183415-16183489
At5g53902	21905532-21905568	At5g46315	18804624-18804790	At5g46315	18804640-18804676
At5g54075	21962428-21962494	At5g53902	21905673-21905701	At5g54075	21962613-21962625, 21962687-21962814
At5g54075	21962613-21962687			At5g61455	24730720-24730727
At5g61455	24730652-24730688				

Таблица 18 - Гены тРНК арабидопсиса, экспрессия которых активируется при истощении экзосом.

<i>rrp4est</i>		<i>rrp41est</i>		<i>csi4-2</i>
AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID
At1g49460	18312576-18312623	At1g49460	18312580-18312594	гены тРНК с повышенной экспрессией не обнаружены
At1g49460	18312580-18312594	At2g21570	9241279-9241347	
At2g15950	6953926-6953951	At2g36280	15215440-15215482	
At2g21570	9241279-9241325	At2g36860	15477247-15477247	
At2g36280	15215440-15215493	At3g10415	3238378-3238378	
At2g36860	15477247-15477293	At3g18952	6540655-6540689	
At3g10415	3238378-3238430	At3g18952	6540646-6540655	
At3g18952	6540642-6540689	At3g48515	17985582-17985582	
At3g18952	6540646-6540655	At4g11177	6819339-6819339	
At3g48515	17985582-17985582	At4g11177	6819297-6819332	
At3g62285	23062440-23062482	At4g22265	11774479-11774479	
At4g03435	1520766-1520819	At4g39195	18254989-18255044	
At4g11177	6819293-6819339	At5g03445	858586-858586	
At4g11177	6819297-6819332	At5g50995	20758858-20758905	
At4g22265	11774479-11774479			
At4g39195	18254989-18255042			
At5g03445	858540-858586			
At5g27715	9816553-9816696			
At5g50995	20758858-20758916			
At5g61445	24726482-24726482			

Таблица 19 - Открытые рамки считывания генов арабидопсиса с повышающей регуляцией 3'-концов аннотированной кодирующей области при истощении ЭКЗОСОМ.

<i>rrp4est</i>		<i>rrp41est</i>		<i>csi4-2</i>
AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	
At1g02350	470966-471002	At1g02350	470966-471002	нет генов с повышающей регуляцией 3'-концов аннотированной кодирующей области
At1g03740	936988-937089	At1g03740	936988-937089	
At1g04000	1027863-1028036	At1g04000	1027863-1028036	
At1g13920	4759970-4760181	At1g13920	4759970-4760181	
At1g17970	6187468-6187503	At1g17970	6187468-6187503	
At1g19730	6822918-6822958	At1g19730	6822918-6822958	
At1g32220	11610283-11610409	At1g32220	11610283-11610409	
At1g36110	13509909-13509913	At1g36110	13509909-13509913	
At1g47710	17562977-17563083	At1g47710	17562977-17563083	
At1g67890	25467202-25467238	At1g67890	25467202-25467238	
At2g17580	7657651-7657686	At2g17580	7657651-7657686	
At2g18190	7924274-7924343	At2g18190	7924274-7924343	
At2g18440	8002717-8003066	At2g18440	8002717-8003066	
At3g01120	38933-38969	At3g01120	38933-38969	
At3g01130	44040-44153	At3g01130	44040-44153	
At3g07860	2509008-2509110	At3g07860	2509008-2509110	
At3g17090	5830230-5830490	At3g17090	5830230-5830490	
At3g18040	6178848-6178920	At3g18040	6178848-6178920	
At3g23860	8616785-8616893	At3g23860	8616785-8616893	
At4g36790	17338743-17338846	At4g36790	17338743-17338846	
At5g01170	60854-60891	At5g01170	60854-60891	
At5g05140	1522945-1523052	At5g05140	1522945-1523052	
At5g11090	3525849-3526134	At5g11090	3525849-3526134	
At5g25280	8774901-8775187	At5g25280	8774901-8775187	
At5g25280	8775632-8775741	At5g25280	8775632-8775741	
At5g38410	15397092-15397165	At5g38410	15397092-15397165	
At5g44060	17749220-17749404	At5g44060	17749220-17749404	
At5g44100	17770880-17770921	At5g44100	17770880-17770921	
At5g61580	24781435-24781545	At5g61580	24781435-24781545	

Таблица 20 - Первичные транскрипты микроРНК арабидопсиса, активирующиеся при истощении экзосом.

<i>rrp4est</i>		<i>rrp41est</i>		<i>csi4-2</i>
AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	AtID	Области повышенной экспрессии при истощении экзосом	
AT1G18075	6220328-6220516	AT1G18075	6220328-6220586	в анализе <i>csi4-2</i> не обнаружены гены микроРНК с повышенной экспрессией
AT1G48267	17829321-17829390	AT1G48267	17829321-17829390	
AT1G73687	27717035-27717250	AT1G73687	27717035-27717250	
AT1G77235	29021194-29021266, 29021359-29021465	AT1G77235	29021121-29021266, 29021359-29021465	
AT2G25095	10683608-10683753, 10683990-10684094	AT2G25095	10684026-10684094	
AT2G39175	16347021-16347209	AT3G51375	19084352-19084392	
AT3G51375	19084352-19084392	AT4G19395	10578557-10578634	
AT4G23713	12352837-12352910	AT5G10945	3456901-3456977	
AT5G08185	2635087-2635198	AT5G11977	3867089-3867160	
AT5G10945	3456901-3456977	AT5G26147	9135962-9136032	
AT5G11977	3867089-3867160	AT5G46845	19026429-19026508	
AT5G46845	19026429-19026508			

5.4 РНК-мишени экзосомы арабидопсиса

5.4.1 Стабильные структурные РНК

Анализ массива данных, полученных на микрочипах, позволил идентифицировать большое количества сигналов, свидетельствующих о наличии полиаденилированной РНК в регионе повторов рДНК даже в нормальных условиях, которые резко усиливались при недостатке белков RRP4 или RRP41 (рис. 51). Такое увеличение и распространение сигнала в значительной степени связано с полиаденилированием предшественников пре-рРНК. Например, нозерн-анализ, направленный на последовательности, следующие за 5.8S рРНК, выявил возрастание количества полиаденилированных, 3'-недопроцессированных продуктов длиной 2,4 тыс. п.н. (рис. 51 С, вверху), которые включали в себя

участки как 18S, так и 5,8S зрелой рРНК, в то время как ни неполиаденилированные предшественники (рис. 51 С, внизу), ни уровни зрелых рРНК (данные не показаны) не были затронуты. Кроме того, два основных кластера сайтов полиаденилирования, идентифицированных с помощью 3'-RACE, были расположены за пределами границ зрелой рРНК (Chekanova et al. 2007). Наши наблюдения полностью согласуются с проведенными ранее исследованиями на дрожжах, в которых было показано, что таргетирование продуктов пре-рРНК для дальнейшей деградации экзосомой механистически связано с их олигоаденилированием с помощью комплекса TRAMP (Kadaba et al., 2004; Vanacova et al., 2005).

Кроме того, анализ мозаичных микрочипов и количественная ПЦР выявили повышенное содержание поли(А)⁺ РНК в межгенной спейсерной области (IGS, рис. 51А и 51В). Примечательно, что в клетках мыши РНК, полученная из IGS, регулирует активность основного промотора рДНК эпигенетически стабильным образом (Mayer et al., 2006). Истощение белков RRP4 и RRP41 также влияет на обилие полиаденилированных РНК антисмысловой полярности по сравнению с рРНК. К примеру, мы наблюдали сильное увеличение количества транскриптов, комплементарных внешнему транскрибируемому спейсеру (ETS, англ. External Transcribed Spacер) и 5'-участку 25S рРНК. Наоборот, истощение экзосом привело к значительному уменьшению количества антисмысловой РНК, границы которой близко соответствуют границам 18S рРНК. Примечательно, что данная полиаденилированная антисмысловая РНК непосредственно окружена полиаденилированной смысловой РНК, что указывает на взаимоисключающие отношения. Более того, в проростках *cs14-2*, в которых не происходило повышения экспрессии смысловой поли(А)⁺ РНК в области 18S, упомянутый антисмысловый продукт не подавлялся (рис. 51А). Следовательно, полученные результаты могут указывать на то, что рРНК регулируются комплементарными антисмысловыми транскриптами (Chekanova et al. 2007).

Также данные, полученные на мозаичных микрочипах, показали, что истощение RRP4 и RRP41 привело к резкому увеличению накопления поли(А)⁺

мяРНК и мякРНК, включая те, которые кодируются отдельными полицистронными кластерами, одиночными генами, а также встроенными в интроны генами, функционально связанными с синтезом белка. Такая организация генов помогает координированию биогенеза мякРНК, необходимого для трансляции в клетках и преобладает у животных, но у арабидопсиса была описана только один раз (Barneche et al., 2000). Кроме того, мы идентифицировали 3'-протяженные поли(А)⁺ мякРНК с повышенной экспрессией, которые могут представлять собой либо не полностью процессированные побочные продукты биогенеза мякРНК, предназначенные для деградации, либо нормальные промежуточные продукты процессинга (Chekanova et al. 2007).

В целом наши наблюдения массового накопления в проростках с истощенными экзосомами поли(А)⁺ форм стабильных РНК убедительно свидетельствуют о том, что олигоденилирование в сочетании с опосредованным экзосомами контролем качества РНК и/или процессингом являются фундаментальными характеристиками экспрессии генов растений, в том числе и генов, связанных с репродукцией и развитием (Chekanova et al. 2007).

5.4.2 РНК, ассоциированные с гетерохроматическими повторами, и новые некодирующие РНК

Эксперименты с мозаичными микрочипами выявили накопление многочисленных поли(А)⁺ транскриптов с неизвестными функциями, которые не обладают потенциалом кодирования белка. Большая часть этих типов РНК не была обнаружена предыдущими анализами транскриптома (Meiners et al., 2004, Yamada et al., 2003), по-видимому, потому, что их устойчивый уровень в растениях дикого типа резко снижается за счет деградации, опосредованной экзосомой. Эти РНК значительно перекрывались в растениях *rrp4^{iRNAi}*, *rrp41^{iRNAi}* и *cs14-2* (рис. 47С). Интересно, что эти новые, специфичные для экзосом РНК, обнаруживали устойчивую ассоциацию с миРНК-продуцирующими локусами, а также с повторяющимися последовательностями: 72% от *rrp4^{iRNAi}* и 63% от *rrp41^{iRNAi}* (р

<0,001; рис. 52) (Chekanova et al. 2007). Другой характерный пример относится к специфичной для экзосомы паре смысловых/антисмысловых транскриптов, происходящей из региона повторов, содержащего tandemные повторы длиной 42 п.н. Такие пары смысловых/антисмысловых транскриптов служат предшественниками для ~24-нуклеотидных эндогенных гетерохроматиновых малых интерферирующих РНК (миРНК), которые направляют РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM) и метилирование H3K9 транспозонов и локусов tandemных повторов (Cao et al., 2003, Lippman, Martienssen, 2004, Zilberman et al., 2004; Bukhin, Albertini, 2021). Таким образом, мы подтвердили повышенную экспрессию области 5S рДНК, которая дает начало миРНК1003, в проростках с истощением RRP4 и RRP41, а также в мутантных растениях *cs14-2* (уровни зрелой 5S рРНК не изменились). Примечательно, что новые некодирующие РНК, специфичные для экзосом, преимущественно связаны с центромерными и перицентромерными областями генома арабидопсиса, в высокой степени совпадают с участками, содержащими повторяющиеся элементы и метилирование ДНК (Zhang et al., 2006), в то время как мРНК, регулируемые экзосомами, исключены из этих областей. Следовательно, экзосома арабидопсиса может играть большую роль в контроле качества RdDM-ассоциированных предшественников биогенеза миРНК и/или дегградации РНК, ассоциированной с гетерохроматином, как было показано для гетерохроматинового сайленсинга отдельных локусов в *S. pombe* (Bühler et al., 2007). Описанные выше результаты свидетельствуют о том, что экзосома арабидопсиса играет важную роль в регуляции транскриптов, ассоциированных с гетерохроматином.

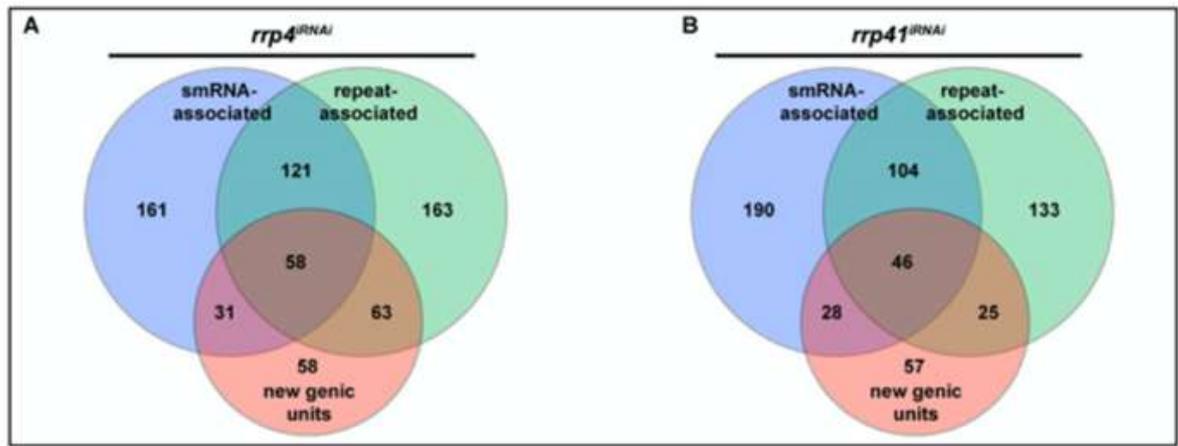


Рисунок 52 - Влияние истощения или мутаций RRP4 и RRP41 субъединиц экзосомы на появление новых транскриптов, связанных с миРНК и повторяющимися элементами.

(А и В) Изображение на диаграмме Венна активирования экзосом-специфических транскриптов и их высоко значимая ассоциация с локусами, генерирующими малые РНК, и повторяющимися элементами. Большинство транскриптов, которые наблюдаются только при истощении экзосом, связаны с локусами, генерирующими миРНК, и/или повторяющимися элементами (72% для *rrp4*^{iRNAi} и 63% для *rrp41*^{iRNAi}).

5.5 Выводы

Ряд научных публикаций сообщает, что пути, опосредованные малыми РНК (sRNA), играют жизненно важную роль в развитии и спецификации женского гаметофита (обзор Aslam et al., 2022). Для исследования функции экзосомного комплекса и изучения его роли в размножении и развитии у модельного растения *Arabidopsis thaliana* мы объединили генетический, протеомный и полнотранскриптомный анализы. Мы обнаружили, что отдельные субъединицы экзосомы растений функционально специализированы, начиная с того, что они

незаменимы для роста и развития, и заканчивая тем, что они необходимы для развития женских гаметофитов (RRP41) или эмбриогенеза (RRP4), то есть являются крайне важными структурами для нормального семенного размножения. Полученные результаты демонстрируют неожиданную степень функциональной пластичности коровой части растительной экзосомы. Проведенный нами полнотранскриптомный анализ на мозаичных микрочипах выявил множество новых субстратов экзосом, неизвестные ранее метаболические аспекты нескольких важных видов РНК, большую роль, которую экзосома играет в регуляции некодирующих РНК, связанных с гетерохроматическими областями, а также широкое распространение полиаденилирования, ассоциированного с осуществляемой экзосомой контролем качества РНК у растений (Chekanova et al. 2007). В то время как механистическую основу дифференциальной чувствительности к истощению RRP4 или RRP41 еще предстоит определить, рассмотренные примеры аналогичны различным фенотипам других мутантов, что подтверждает представление о субфункционализации основных субъединиц экзосом арабидопсиса, аналогично тому, что наблюдалось для протеасомы и регуляторных белков (Brukhin et al., 2005b). Кроме того, наши результаты обнаружили «глубоко скрытый» слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов, которые сильно подавляются конститутивной активностью экзосом. Наконец, существенно пополненная нами общедоступная база данных транскриптомов, регулируемых экзосомами (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/exosome>), должна помочь в освещении новых фундаментальных компонентов и регуляторных механизмов в сложных эукариотических транскриптомах.

Глава 6. Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса и использование геномных технологий для его исследования

Определение и основные типы апомиксиса уже были описаны в разделе 1.4. Кроме того, было сказано и о практическом значении гаметофитного апомиксиса для сельского хозяйства, внедрение которого в культурные растения позволило бы на длительный срок закрепить сложные генотипы, в том числе высоко гетрозиготные и полиплоидные, которые часто способствуют возникновению гибридной силы при гетерозисе. Все это способствовало бы приближению «зеленой революции» в сельском хозяйстве.

Несомненно, арабидопсис остается важным модельным объектом для исследования различных молекулярных процессов у растений, в том числе и для исследования апомиксиса несмотря на то, что природных апомиктов у арабидопсиса выявлено не было. Однако некоторые мутанты последнего с нарушением работы генов, ассоциированных с мейозом, соматическим эмбриогенезом и развитием эндосперма обнаруживали признаки апомиксиса. В этой главе будут рассмотрены гены-кандидаты, мутации в которых у модельных растений вызывают фенотипы, напоминающие элементы апомиксиса, которые мы не так давно публиковали (таб. 21) (Брюхин, 2017; Brukhin, 2017; Brukhin, Baskar, 2019). Три апомиктических рода, которые были подробно изучены, *Hieracium*, *Paspalum* и *Pennisetum*, имеют большие геномы и являются полиплоидными, что является характерным для подавляющего большинства известных в настоящее время апомиктов (Asker, Jerling, 1992; Carman, 1997; Hojsgaard et al., 2014). Хотя упомянутые особенности усложняют молекулярно-генетические исследования, изучение этих природных апомиктов в значительной степени способствовало прогрессу в данной области (обзоры Ortiz et al., 2013; Vicknell et al., 2016; Conner, Ozias-Akins, 2017; Брюхин, 2017). В наших исследованиях мы также использовали природные половые и апомиктические виды из рода *Boechea*. В отличие от ранее изучаемых природных апомиктов, растения из рода *Boechea* имеют относительно небольшой геном (~170–230 Мб), кроме того, *Boechea* — единственный

известный род, у которого апомиксис обнаруживается на аллодиплоидном уровне (далее для простоты будет использован термин просто «диплоидный») в дикой природе (Böcher, 1951; Dobeš et al., 2004a,b; Sharbel et al., 2005; 2010; Voigt-Zielinski et al., 2012; Brukhin et al. 2019). Другим преимуществом является то, что виды из рода *Boechea* являются близкими родственниками модельного растения *Arabidopsis thaliana*, очень хорошо изученного с точки зрения молекулярной генетики и функциональной аннотации генов. Роды *Boechea* (A. Löve et D. Löve) и *Arabidopsis* принадлежат к одной и той же кладе в семействе Brassicaceae. *Boechea* - единственный род из более чем 370 родов семейства Brassicaceae, у которого хорошо задокументирован апомиксис. Апомиктические линии *Boechea* встречаются как на диплоидном, так и на триплоидном уровне и демонстрируют признаки гибридогенного происхождения, что привело к модификации их хромосомной структуры, это выражается в аллоплоидии, анеуплоидии, заменах в гомеологичных хромосомах и наличии абберантных хромосом. В наших исследованиях мы изучали, в том числе, и популяционно-генетические аспекты и возможную роль гибридизации в происхождении апомиксиса у *Boechea*. Геномы апомиктических растений *Boechea* характеризуются крайне высокой гетерозиготностью, также возникшей в результате гибридизационных событий (Schrantz et al., 2005; Koch et al., 2003; Mandáková et al., 2015; Kliver et al., 2018; Brukhin et al., 2019). Последнее создает проблемы для выполнения поэтапной сборки и подробной аннотации геномов апомиктических растений *Boechea* (Hirsch, Buell, 2013; Brukhin et al. 2019). Мы исследовали доступные в базах данных секвенированные геномы *Boechea spp.*, а также произвели полногеномное секвенирование на разных NGS (англ. next generation sequencing) платформах геномов некоторых видов *Boechea* самостоятельно и адаптировали биоинформатические инструменты для решения проблем, связанных со сборкой сильно гетерозиготных геномов апомиктических видов. Также мы осуществили альтернативный метод безреференсной сборки генома, который послужил основой для дальнейшего сравнительного анализа половых и апомиктических геномов.

6.1 Гены, потенциально ассоциированные с апомиксисом

Основными признаками гаметофитного апомиксиса являются апомейоз, партеногенетическое развитие зародыша и независимое от наличия или отсутствия оплодотворения формирование функционального эндосперма. Учеными, изучающими апомиксис было показано, что последний контролируется генетически (Модилевский, 1948; Хохлов, 1967; 1970; Rutishauser, 1969; Солнцева, 1970; 1988; Поддубная–Арнольди, 1976; Nogler, 1984a; Петров, 1988; Crane, 2001; Наумова, 2008; Брюхин, 2017). Эксперименты по скрещиванию апомиктических растений в качестве доноров пыльцы с половыми материнскими растениями продемонстрировали, что апомиксис у многих видов наследуется как доминантный признак (Grossniklaus et al., 2001). Ранние исследования показали, что апомиксис наследуется как единый доминантный локус, например, у *Ranunculus auricomus* и *Panicum maximum*, у которых было обнаружено, что апомейоз и партеногенез косегрегируют, то есть наследуются сцепленно (Savidan, 1982; Nogler, 1984b). Однако более поздние исследования показали, что компоненты развития апомиксиса, т. е. апомейоз, партеногенез и образование автономного эндосперма, у большинства апомиктов контролируют разные локусы. Также было обнаружено, что области генома, отвечающие за апомиксис или апомейоз, демонстрируют подавленную рекомбинацию (рассмотрено в Grossniklaus, 2001; Grossniklaus et al., 2001; Bicknell, Koltunow, 2004; van Dijk, Vijverberg, 2005; Barcaccia, Albertini, 2013; Hand, Koltunow, 2014; Hand et al., 2015; Брюхин, 2017). Апомиксис часто связан с гибридизацией в результате чего могут образоваться полиплоиды (Koltunow, Grossniklaus, 2003), аналогично партеногенетическому размножению у животных, тесно связанному с полиплоидией и гибридизацией между половыми видами (Ryakhovsky et al., 2021; Ochkalova et al., 2022). Дублированная геномная нагрузка может быть причиной нарушения в пространстве и времени регуляции генов, связанных с половым размножением (Grimanelli et al., 2001; Grossniklaus, 2001; Spillane et al., 2001; Koltunow, Grossniklaus, 2003; Barcaccia, Albertini, 2013), так как вновь образованные полиплоидные гибриды часто демонстрируют асинхронную

экспрессию генов, участвующих в размножении (Carman, 1997, 2007; Grimanelli et al., 2001; Grossniklaus, 2001; Van Dijk, 2009). Предполагается, что апомиксис, как способ выхода из бесплодия, является переходным периодом в эволюции неополитипоидов, особенно факультативных (Hörandl, Hojsgaard, 2012; Hojsgaard et al., 2014). Существуют данные, указывающие на то, что апомиксис связан с увеличением генетического разнообразия (Hojsgaard et al., 2014), что может предполагать его фактическое соучастие в возникновении новых полиплоидов (Hojsgaard, 2018) и диверсификации покрытосеменных растений (Brukhin, Baskar, 2019).

Поскольку апомиксис является производным полового размножения, хотя есть предположения и об обратном (Carman, 1997), многие гены, регулирующие половое размножение, также имеют решающее значение для контроля апомиктических путей. Одним из основных признаков развития апомиксиса является пространственное и временное нарушение регуляции половых процессов. Апомиксис способствует нарушению регуляции половых путей, при этом контроль экспрессии генов играет значительную роль в его развитии. Например, у арабидопсиса мутация в гене *OSDI* (*Omission of Second Division I*), контролирующем вступление во второе мейотическое деление (Cromer et al. 2012), в сочетании с двумя другими мутациями рецессивных генов, *Atspoll-1* и *Atrec8*, приводило к дерегуляции мейоза и замещению его митозом при скрещиваниях. Полученный тройной мутант у арабидопсиса, имитирующий апомейотический фенотип, был назван *MiMe* (англ. Mitosis instead of Meiosis - митоз вместо мейоза) (D'Erfurth et al., 2009; Hou et al., 2020). Эпигенетические модификации у апомиктических гибридов и полиплоидов приводят к временной дерегуляции, при которой этапы развития, обычно проявляющиеся последовательно, начинают происходить одновременно, вызывая апомейотическое развитие зародышевого мешка, характерное для апомиксиса (Carman, 2007). Как уже упоминалось в главе 4, ген *MEDEA* (*MEA*) участвует в контроле независимого от оплодотворения развития эндосперма. Этот ген связан с эпигенетическим регуляторным репрессивным комплексом Polycomb 2 (PRC2). Функция PRC2 заключается в

подавлении экспрессии генов посредством триметилирования лизина 27 у гистона H3 (H3K27me3). Утрата функции *MEA* у мутантов арабидопсиса *mea* приводит к развитию семян, независимых от оплодотворения (Grossniklaus et al., 1998; Schmidt et al., 2013), признаку, который наблюдается у некоторых апомиктов. Более подробно роль эпигенетической регуляции в размножении и развитии растений будет рассмотрена в главе 7.

С эволюционной точки зрения апомиксис способствует репродуктивной изоляции бесполок популяций, нарушению генетической целостности, образуя разрозненные генофонды в популяции, развивающиеся самостоятельно, тем самым увеличивая ареал распространения и экологическую пластичность (Hörandl, Hojsgaard, 2012; Hojsgaard et al., 2014). Ускоренная генетическая дифференциация и экологическое видообразование способствует биоразнообразию в бесполок комплексах. Предполагаемые гены, ассоциированные с апомиксисом, и их биологическая функция представлены в таблице 21. Прежде всего это три основных группы генов, которые отвечают за возникновение митоза вместо мейоза, за независимое от оплодотворения деление яйцеклетки и дальнейшее развитие зародыша, а также за автономное развитие эндоспрема (Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019). Кроме того, биоинформатическим путем нами был обнаружен ряд генов, ассоциированных с апомиксисом, в апомиктической линии M4В у *Boechea*. О том как идентифицировались эти гены будет обсуждено дальше в этой главе.

Несмотря на прогресс в исследовании генов, которые имеют отношение к апомиксису, произошедший в последние десятилетия, к сожалению, молекулярные механизмы, лежащие в основе апомиксиса, изучены недостаточно. Лучшее понимание генетических сетей, которые контролируют компоненты апомиксиса, играет решающую роль для его внедрения в культурные растения, что имеет большое агрономическое значение.

Таблица 21 - Гены, ассоциированные с апомиксисом

Название гена	Природа гена и кодируемого белка	Функция белка	Ссылка
AT5G51330(<i>Arabidopsis</i>) <i>DYAD/SWITCH</i>	Содержит фосфолипазу C, фосфатидилинозитол-специфический домен	Участвует в схождении сестринских хроматид и мейотической организации хромосом во время мейоза. Потеря функции у мутантов способствует образованию диад вместо тетрад.	Siddiqi et al. (2000), Mercier et al. (2001), Ravi et al. (2008)
AT3G57860 <i>UVI4-LIKE</i> (<i>OSD1</i>)		Контролирует вступление во второе мейотическое деление. Отрицательно регулирует комплекс, способствующий анафазе (циклосому). Мутанты демонстрируют диплоспорию.	Cromer et al. (2012)
AT3G13170 <i>SPO11</i>	Кодирует субъединицу VIA ДНК-топоизомеразы. Необходим для мейотической рекомбинации	Участвует в организации хроматина и способствует диплоспории.	Sprink, Hartung (2014)
AT5G05490 <i>REC8</i>	Кодирует RAD21-подобный ген, необходимый для мейоза.	Участвует в расхождении гомологичных хромосом, репарации двухцепочечных разрывов, конденсации хромосом и когезии сестринских хроматид при мейозе. Мутанты с потерей функции демонстрируют диплоспорию.	Bhatt et al. (1999)
<i>ARGONAUTE</i> (<i>AGO4</i> , <i>AGO6</i> , <i>AGO8</i> , <i>AGO9</i> , <i>AGO5</i>)	Кодирует слайсер РНК, который выборочно мобилизует микроРНК и миРНК	Мутанты с потерей функции обнаруживают апоспорию.	Olmedo-Monfil (2010), Singh et al. (2011), Meister (2013), Rabiger et al. (2016)
AT3G49500 <i>RDR6</i>	Кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу	Мутанты с потерей функции продуцируют эктопическую материнскую клетку мегаспоры, обнаруживают апоспорию.	Peragine et al. (2004)
AT5G23570 <i>SGS3</i> <i>SUPPRESSOR OF GENE</i> <i>SILENCING 3</i>	Кодирует спиральные домены, предполагающие олигомеризацию и потенциальный цинк-пальцевый домен	Фенотип апоспории	Peragine et al. (2004)
AT3G33520 <i>ARP6</i>	Кодирует ACTIN-RELATED PROTEIN6 (<i>ARP6</i>), предполагаемый компонент комплекса ремоделирования хроматина. Требуется как для ацетилирования гистонов, так и для метилирования хроматина FLC у арабидопсиса.	Мутанты демонстрируют дефекты фертильности и более короткое время цветения. Потеря функции у мутантов обнаруживает апоспорию.	Meagher et al. (2007)
AT5G17430 <i>BABY</i> <i>BOOM</i> (<i>BBM</i>)	Кодирует ANT- подобный белок, содержащий домен AP2. Семейство транскрипционных факторов AP2/ERF.	Индукцирует партеногенез	Boutillier et al. (2002)
AT5G47670 <i>LEC1</i>	НАРЗ субъединица, связывающая ССАТ-бокс.	Регулятор развития зародыша: соматический эмбриогенез	Gaj et al. (2005), Wang, Perry (2013)
AT1G28300 <i>LEC2</i>	Семейство факторов транскрипции В3	Участвует в соматическом эмбриогенезе, регуляции транскрипции, созревании семян, биогенезе масляных телец семян.	Gaj et al. (2005), Wang, Perry (2013)
AT2G17950 <i>WUS</i>	Хоумбокс белок	Требуется для поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии. Вызывает образование соматических зародышей.	Laux et al. (1996)
AT5G58230 <i>MSI1</i>	Кодирует белок, содержащий повтор WD-40, который принимает участие в сборке хроматина как часть комплекса CAF1 и FIE.	Компонент PRC2, автономный эндосперм. Мутанты демонстрируют партеногенетическое развитие, включающее пролиферацию неоплодотворенного эндосперма и зародышей.	Guitton and Berger (2005), Dumbliuskas et al. (2011)
AT1G02580 <i>MEA</i>	Компонент PRC2, белок домена SET.	Автономное развитие эндосперма. Мутации в этом локусе приводят к эмбриолетальности.	Grossniklaus et al. (1998), Schmidt et al. (2013)
AT2G35670 <i>FIS2</i>	ДНК-связывающий фактор транскрипции.	Отрицательный регулятор развития семян в отсутствие опыления. У мутантов развивается автономный эндосперм. Участвует в метилировании	Chaudhury et al. (1997), Luo et al. (1999)

AT3G20740 <i>FIE</i>	Кодирует белок, аналогичный транскрипционному регулярному белку группы Polycomb животных.	ДНК, регуляции развития эндосперма, геномном импринтинге.	Ohad et al. (1999)
AT5G04560 <i>DEMETER (DME)</i>	Кодирует ДНК-гликозилазу DEMETER (DME).	Участвует в сайленсинге хроматина, метилировании гистонов, развитии многоклеточных организмов, негативной регуляции транскрипции с помощью РНК-полимеразы II, регуляции развития эндосперма, генетическом импринтинге.	Schoft et al. (2011)
<i>APOLLO (APOmixis Linked LOcus) (Boechea)</i>	Аспартат-глутамат Аспартат-аспартат-гистидинэкзонуклеаза	Компонент PRC2, у мутантов формируется автономный эндосперм. Отвечает за специфичное для материнской аллели гипометилирование эндосперма в <i>MEDEA (MEA)</i> , регуляцию экспрессии генов путем генетического импринтинга.	Corral et al. (2013), Kliver et al. (2018) Bakin et al. (2022)
<i>LOSS OF APOMEIOSIS (LOA) (Hieracium)</i>	Расположен субтеломерно на одной удлиненной гемизиготной хромосоме, область локуса бедна генами и обогащена простыми и сложными повторами, а также транспозонами.	Имеет «апоаллели» и «половые аллели», апомиктические <i>Boechea</i> spp. гетерозиготны по гену <i>APOLLO</i> , половые генотипы гомозиготны по половым аллелям	Kotani et al. (2014)
<i>LOSS OF PARTHENOGENESIS (LOP) (Hieracium)</i>	Кодирует несколько генов, связанных с эпигенетической регуляцией генов.	Локус <i>LOA</i> контролирует инициацию апомиксиса, формирование митотического зародышевого мешка (апоспория) и подавление полового пути.	Koltunow et al., 2011, Bräuning et al., 2018
<i>PARTHENOGENESIS (PAR)(Taraxacum)</i>	Кодирует цинк-палецевый K2-2, белок EAR-домена. Доминантная аллель PAR экспрессируется в яйцеклетках и имеет миниатюрную инсерцию транспозона с инвертированным повтором (MITE) в промоторе.	<i>LOP</i> стимулирует независимое от оплодотворения образование зародыша и эндосперма. Потеря функции приводит к частичному возврату к половому размножению, а потеря функции в <i>LOP</i> и <i>LOA</i> приводит к полному возврату к половому размножению.	Underwood et al., 2022

6.2 Растения из рода *Boechea* как ресурс для исследования апомиксиса

Апомикты из рода *Boechea* представляют собой удобную модель для изучения апомиксиса, поскольку последний также встречается у них и на диплоидном уровне, а геномы видов *Boechea* сравнительно невелики. В этом разделе будет рассмотрено использование растений *Boechea* в наших экспериментах по исследованию апомиксиса.

6.2.1 Таксономия и местообитания наиболее важных видов *Boechnera*

Род *Boechnera* включает в себя в основном североамериканские виды двулетних и многолетних травянистых крестоцветных, характеризующихся базовым числом хромосом $n = 7$. Ранее эти виды относились к роду *Arabis* L., из которого были исключены на основании различия в базовом числе хромосом (Löve, Löve, 1976), которое у *Arabis* spp. равно $n = 8$. Молекулярно-генетические данные подтвердили различие между двумя родами. Было показано, что сходство между ними носит конвергентный характер, представляя две эволюционно независимые линии Brassicaceae (Al-Shehbaz, 2003). В последнее время таксономия рода *Boechnera* получила дальнейшее развитие с использованием молекулярных маркеров. В настоящее время в этом роде описано 110 видов, 71 из них являются диплоидными и предположительно половыми, хотя описаны и диплоидные апомикты, а 38, как сообщается, являются апомиктическими триплоидами гибридогенного происхождения (Windham, Al-Shehbaz, 2006, Windham, Al-Shehbaz, 2007a, b). Таким образом, *Boechnera* является пятым по величине родом в семействе Brassicaceae (Осадчий и др., 2017; Brukhin et al., 2019).

В большинстве исследований репродуктивной биологии *Boechnera* задействовано лишь небольшое количество видов. Это широко распространенные половые диплоиды *Boechnera stricta* (A. Gray) A. Löve & D. Löve (рис. 53А), половые и апомиктические растения, ранее известные под названием *Boechnera holboellii* (*sensu lato*, *s. l.*) (Hornem.) A. Löve & D. Löve, а также апомикты гибридогенного происхождения, ранее относившиеся к *Boechnera divaricarpa* (A. Nelson) A. Löve & D. Löve (Windham, Al-Shehbaz, 2007b) (рис. 53В). В ряде исследований также использовали *Boechnera gunnisoniana* (Rollins) W.A. Weber (Taşkin et al., 2003, 2004, 2009a; Schmidt et al., 2014; Kirioukhova et al., 2018; Brukhin et al., 2019). Остальные виды исследовались в основном для изучения отдельных аспектов апомиксиса у географически большого числа видов (Aliyu et al., 2010; Corral et al., 2013; Mau et al., 2013, 2015; Mandáková et al., 2015; Carman et al., 2019).

До недавнего времени плейстоценовый реликт *B. holboellii* (*Arabis holboellii*) трактовался в широком смысле как вид с дизъюнктивным ареалом (т. е. состоящий из нескольких географически обособленных ареалов по причинам исторического характера) (Böcher, 1951). Однако

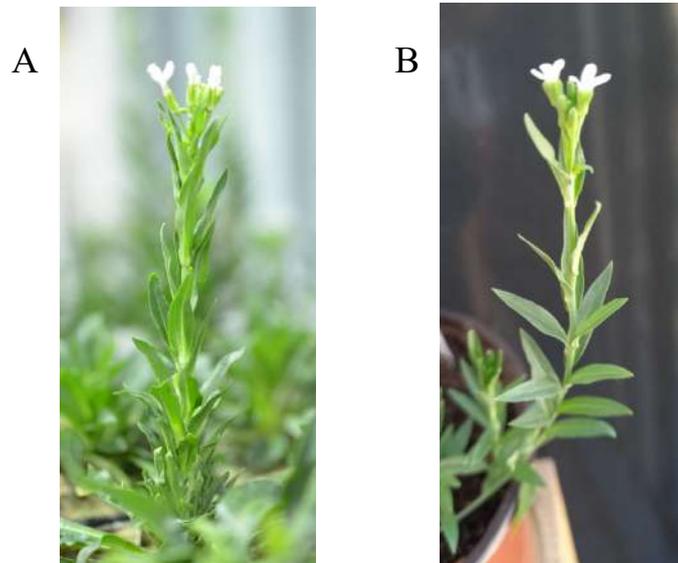


Рисунок 53 - Растения из рода *Boechea*: (А) Половое *B. stricta*; (В) Апомиктичное *B. divaricarpa* (линия ES517).

относительно недавние таксономические исследования с использованием молекулярных маркеров показали, что это полифилетический искусственный таксон, включающий ряд различных видов (Windham, Al-Shehbaz, 2006; Alexander et al., 2013). В настоящее время *B. holboellii* рассматривают в узком смысле как растения, произрастающие в Гренландии. Он включает половые и апомиктические диплоидные и триплоидные формы, причем последние, в отличие от североамериканских видов, являются автотриплоидами (Windham, Al-Shehbaz, 2006; Осадчий и др., 2017; Brukhin et al., 2019).

Континентальные североамериканские линии, ранее входившие в состав *B. holboellii*, выделяют как серии отдельных видов, образующих агамный комплекс (Stebbins, 1950). Основу этого комплекса составляют четыре диплоидных половых вида, у которых, однако, нельзя исключить наличие факультативного апомиксиса:

Boechea collinsii (Fernald) A. Löve & D. Löve, *Boechea pendulocarpa* (A. Nelson) Windham & Al-Shehbaz, *Boechea polyantha* (Greene) Windham & Al-Shehbaz и *Boechea retrofracta* (Graham) A. Löve & D. Löve. Остальные виды — триплоидные апомикты гибридогенного происхождения, морфологически очень близкие к родительским половым видам: *B. consanguinea* (*retrofracta* × *fendleri*), *B. goodrichii* (*retrofracta* × *gracilipes*), *Boechea grahamii* (*stricta* × *collinsii*), *B. pauciflora* (*sparsiflora* × *retrofracta*), *B. pinetorum* (*rectissima* × *retrofracta* × *sparsiflora*), *Boechea quebecensis* (*holboellii* × *stricta*) и *B. tularensis* (*retrofracta* × *rectissima* × *stricta*) (Windham and Al-Shehbaz, 2007a, b). *B. quebecensis* распространен в изолированных районах Северо-Восточной Америки, что допускает присутствие одного из его предполагаемых родителей (гренландского *B. holboellii* s. s.) на североамериканском континенте в прошлом (Scharbel et al., 2001; 2005; 2009; Lovell et al., 2013; Mandáková et al., 2015; Осадчий и др., 2017; Brukhin et al., 2019).

Апомиктический *B. divaricarpa*, вероятно, является наиболее проблематичным видом рода с таксономической точки зрения. Традиционно большое разнообразие гибридов с участием *B. stricta* в качестве одного из родителей (в том числе *B. stricta* × *B. holboellii* s.l.) во многих статьях по репродуктивной биологии рода *Boechea* называли *B. divaricarpa*. Такое неосторожное использование названия может стать потенциальным источником путаницы. Как утверждают Windham и Al-Shehbaz (2007b), правильное использование названия *B. divaricarpa* должно ограничиваться растениями, содержащими геномы *B. stricta* и *B. sparsiflora*. Для гибридов *B. stricta* × *B. collinsii* следует использовать название *B. grahamii*. Гибриды *B. stricta* × *B. holboellii* s.s. следует называть *B. quebecensis*. В тех случаях, когда второй родитель гибрида неясен, имя «*B. divaricarpa*» следует избегать и заменять на гибрид «*B. stricta*».

В плане перспективных моделей для изучения апомиксиса внимания заслуживает *B. gunnisoniana*. Это триплоидный вид предположительно гибридогенного происхождения с диплоидными половыми видами *B. oxylobula* и *B. thompsonii* (= *B. pallidifolia*) в качестве родителей (Mateo de Arias, 2015). Он характеризуется почти облигатным псевдогамным апомиксисом (Roy, 1995; Taşkın

et al., 2004; Schmidt et al., 2014), небольшими размерами растений и относительно быстрым развитием (примерно 4 месяца от посева до посева).

Хотя подавляющее большинство видов рода *Boechea* произрастает в Северной Америке, сообщалось о появлении двух предполагаемых видов *Boechea* в Сибири и на Дальнем Востоке России, что представляет собой пример восточноазиатско-североамериканской флористической дизъюнкции. *B. falcata* (Turcz.) Al-Shebaz (рис. 5) из Сибири и Дальнего Востока России тесно связан с известными североамериканскими апомиктами (*Boechea s. s.*) согласно молекулярным маркерам (Al-Shehbaz, 2005; Kiefer et al., 2009; Alexander et al. al., 2013), а ее более детальное изучение на предмет возможного наличия апомиксиса представляет большой интерес. Другой вид — эндемик Прибайкалья и Дальнего Востока России — *Borodinia* (= *Boechea*?) *macrophylla* (Turcz.) German. Недавние молекулярно-генетические исследования показали ее тесную связь с семью видами *Boechea* из восточной части США (Al-Shehbaz, German, 2010; Alexander et al., 2013). Согласно нашим исследованиям, *B. falcata* из района Колымы является половым видом (рис. 5, 6). Мы осуществили полногеномное секвенирование, сборку и аннотацию генома этого вида, его геном оказался высоко гомозиготным, что также характерно для видов, размножающихся половым путем. Геном и способы размножения байкальской *Borodinia* (рис. 54) мы изучаем в настоящее время.



Рисунок 54 - *Borodinia macrophylla* (Turcz.) German, собранная нами в Прибайкалье, в Бурятии.

6.2.2 Преимущества рода *Boechnera* для изучения апомиксиса

За последнее десятилетие различные виды рода *Boechnera* получили широкое распространение в ряде лабораторий в качестве модели для изучения молекулярной основы апомиксиса для изучения в эволюционной экологии (обзор в Rushworth et al., 2011). Преимущества, благодаря которым виды *Boechnera* стали использоваться в качестве модели, являются следующими:

- 1) Близкое родство с модельным растением *A. thaliana* (L.) Heynh. (Huang et al., 2016), для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы, включая полностью секвенированный и очень хорошо аннотированный геном, а также в геноме арабидопсиса обнаружено и функционально изучено множество генов, так или иначе необходимых для репродукции, что облегчает поиск генов, участвующих в контроле апомиксиса у *Boechnera spp.*;
- 2) Небольшой размер его генома в пределах ~170–230 М п.н.;
- 3) Наличие апомиксиса не только на полиплоидном, но и на аллодиплоидном уровне ($2n = 14$), что представляет собой исключение из известных апомиктических растений (Böcher, 1951; Voigt-Zielinski et al., 2012; Lovell et al., 2017);
- 4) Образование нередуцированных мегаспор в результате диплоспории *Taraxacum*-типа (Naumova et al., 2001; Crane, 2001; Осадчий и др., 2017; Brukhin et al., 2019), которая очень напоминает половое мейотическое развитие, но видоизменяется с образованием двух нередуцированных спор вместо четырех редуцированных; разные линии *Boechnera* демонстрируют разную степень синаптических нарушений при апомейозе: существуют полносинаптические, частично синаптические и полностью асинаптические формы;
- 5) Апомиктические виды *Boechnera* псевдогамны, что редко встречается среди видов с диплоспорией (Talent, 2009);
- 6) Апомиксис у растений из рода *Boechnera* всегда факультативен, что позволяет проводить гибридизацию и определенный генетический анализ даже с почти облигатными апомиктическими формами;

- 7) Наличие как половых, так и апомиктических видов из рода *Boechea* и линий с различной ploидностью, и различного географического происхождения; генетические различия между многими видами и линиями очень малы, что облегчает поиск гомологичных последовательностей при молекулярных исследованиях;
- 8) Половые формы *Boechea* самосовместимы и в значительной степени самоопыляются, в отличие от половых предков большинства других апомиктов, которые самонесовместимы и опыляются перекрестно; вследствие самоопыления эти половые формы имеют крайне низкую гетерозиготность;
- 9) Доступные методы генетической трансформации посредством соматического эмбриогенеза в культуре тканей апомиктических *B. gunnisoniana* и *B. holboellii s. l.* (Taşkin et al., 2003, 2009b).

6.2.3 Цитоэмбриологические и проточно цитометрические исследования *Boechea*

Первые детальные цитоэмбриологические исследования апомиксиса видов из рода *Boechea* были предприняты датским ботаником Тиге В. Бёхером (Tyge W. Böcher), в честь которого позже и был назван этот род (Böcher 1947; 1951; 1954; 1969). Он обнаружил наличие апомиксиса у *B. holboellii s.l.* (названной им как *Arabis holboellii*) у диплоидных и триплоидных растений, а также описал мегаспорогенез и микроспорогенез у ряда половых и апомиктических линий *Boechea* из Гренландии и Северной Америки. Особенно примечательно его описание форм с разной степенью синапсиса хромосом в профазе мейоза. Он также отмечал наличие растений с разным уровнем ploидности (в основном $2n$ и $3n$, реже $4n$, $5n$ и $6n$) и анеуплоидов ($2n = 16, 22, 23$ и 30), для последних Бёхер предполагал гибридный характер кариотипа (Böcher, 1954; обзор Brukhin et al., 2019).

Мы провели эмбриологические исследования просветленных препаратов и гистологических срезов семязачатков *B. holboellii s.l.* (растения из Гренландии и Колорадо) с использованием дифференциальной интерференционно-контрастной

микроскопии (DIC) и проточно-цитометрического скрининга семян (FCSS) (Naumova et al., 2001; Brukhin et al., 2019; Осадчий и др., 2017), а также *B. falcata* (рис. 6) из Восточной Сибири, американской апомиктической *B. divaricarpa* (линия ES517) и полового гибрида *B. stricta*. В семязачатках этих видов было обнаружено наличие мейоза и апомейоза во время мегаспорогенеза (рис. 55–58). Путем скрининга большого количества просветленных семязачатков было подтверждено образование нередуцированного зародышевого мешка посредством диплоспории и партеногенетического развития зародыша у апомиктических линий *Boechea*. У половых линий развитие зародышевого мешка происходит по типу *Polygonum* (рис. 6, 55, 57): диплоидная материнская клетка мегаспоры (ММС) претерпевает мейоз с образованием тетрады гаплоидных мегаспор, три из которых дегенерируют, а функциональная мегаспора проходит через три митотических деления с образованием восьмиядерного семиклеточного зародышевого мешка, состоящего из яйцеклетки, двух синергид, трех антиподальных клеток и двух полярных ядер, которые сливаются, образуя гомодиплоидное ядро центральной клетки (см. также рис. 2 и раздел 1.2). После опыления вегетативная клетка пыльцы прорастает, образуя пыльцевую трубку, транспортирующую спермии в зародышевый мешок, которые позже оплодотворяют яйцеклетку и центральную клетку, давая начало $2n$ зародышу и $3n$ эндосперму соответственно (рис. 55, 57).

У апомиктических растений из рода *Boechea* наиболее часто встречается диплоспорический апомейоз *Taraxacum* типа (Crane, 2001) (Böcher, 1951; Naumova et al., 2001; Schmidt et al., 2014; Mateo de Arias, 2015; Windham et al., 2015; Brukhin et al., 2019; рис. 56–58). При мейотической диплоспории зародышевый мешок образуется из ММС, которая подвергается aberrantному мейозу без расхождения хромосом, что приводит к образованию диады нередуцированных мегаспор (рис. 56–58). Характерной чертой ММС является отсутствие отложения каллозы в клеточной стенке (Rodkiewicz, 1970; Nogler, 1984a; Carman et al., 1991). Напротив, наличие каллозы наблюдалось в клеточной стенке между двумя клетками диады (рис. 56D). Наиболее часто у диплоспорических апомиктов из рода *Boechea* наблюдается образование диад (Roy, 1995; Taşkin et al., 2004; Schmidt et al., 2014),

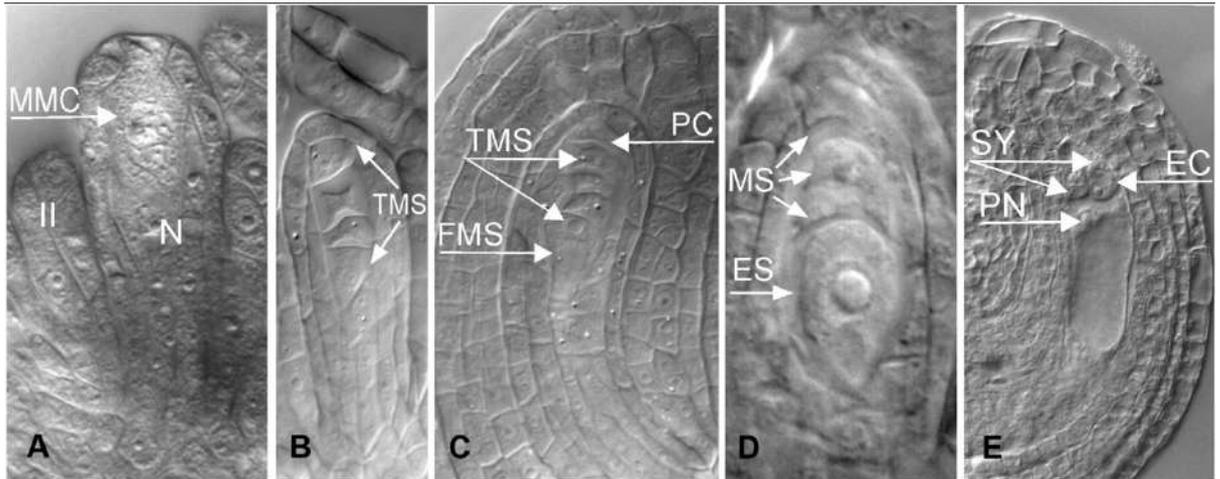


Рисунок 55 - Мейотический (половой) мегаспорогенез в семязачатках *B. holboellii s.l.* (A) материнская клетка мегаспоры (MMC), нуцеллус (N); (B,C) тетрада мегаспор (TMS), функциональная мегаспора (FMS) на халазальном конце; (D) одноядерный мейотический зародышевый мешок (ES) с остатками дегенерирующих, нефункциональных мегаспор (MS); (E) зрелый семиклеточный зародышевый мешок *Polygonum* типа с яйцеклеткой (EC), двумя синергидами (SY) и центральной клеткой с двумя полярными ядрами (PN) (A,C,E – Naumova et al., 2001; B, D – Осадчий и др., 2017).

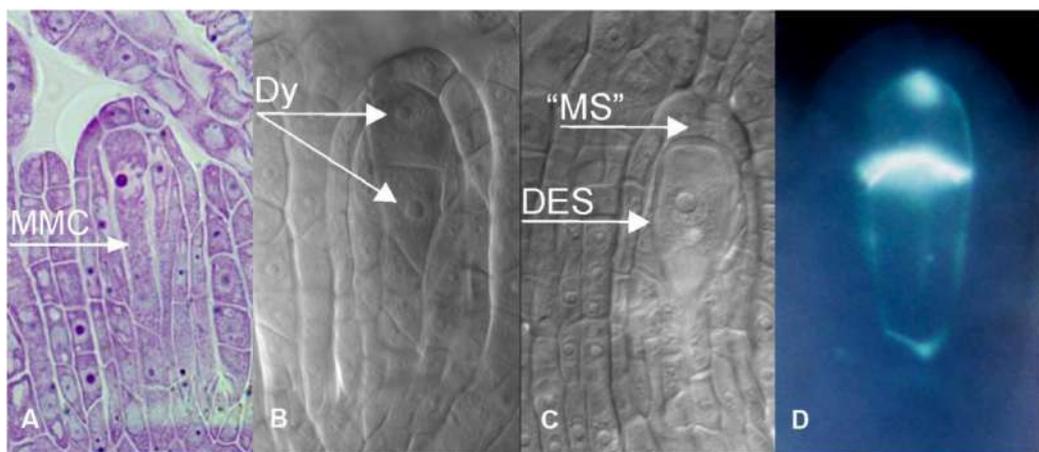


Рисунок 56 - Апомейотический мегаспорогенез у *B. holboellii s.l.* (A) материнская клетка мегаспоры (MMC); (B) диада, образовавшаяся благодаря диплоспории (Dy); (C) одноядерный диплоспорический зародышевый мешок (DES) с остатками нефункциональных мегаспор ('MS'); (D) флуоресцентное изображение зародышевого мешка.

«мегаспоры» («MS»); (D) каллоза в клеточной стенке диплоспорической диады (B,C – Naumova et al., 2001; AD – Осадчий и др., 2017).

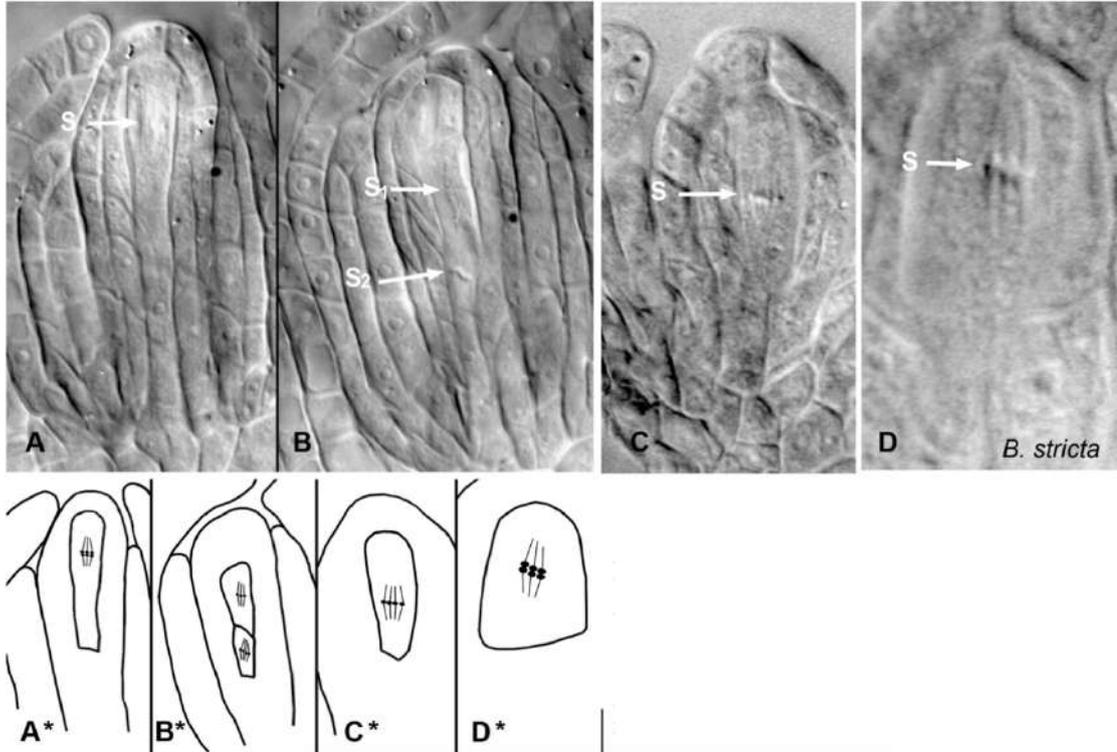


Рисунок 57 - Мейоз и апомейоз у *B. holboellii s.l.* (A–C, A*–C*) и *B. stricta* (D, D*). (A, A*) - метафаза I, мейотическое веретено (S); (B, B*) - два мейотических веретена в метафазе II (S1 и S2); (C, C*) – веретено эквационного деления при апомейозе (S); (D, D*) - метафаза I, мейотическое веретено (S) в половой *B. stricta* (B) (Осадчий и др., 2017).

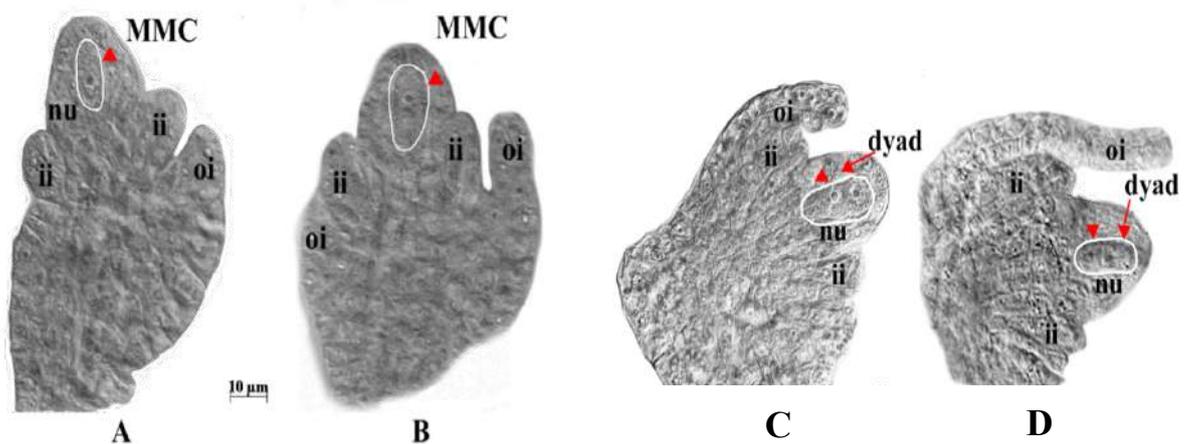


Рисунок 58 - Семязачатки апомиктического природного гибрида *B. stricta* (M4B) и *B. divaricarpa* (ES517) на стадии материнской клетки мегаспоры (MMC) (A, B) и диады (C, D): A, C – линия M4B; B, D – линия ES517. Стрелки указывают на ядра. Сокращения: ii – внутренний интегумент, nu – ядро, oi – наружный интегумент. Масштабная линейка – 10 мкм.

однако изредка встречаются триады и даже тетрады (Schmidt et al., 2014). Халазальная клетка диады совершает три раунда митоза, образуя нередуцированный восьмиядерный зародышевый мешок, морфологически сходный с типом *Polygonum* (Crane, 2001; Rojek et al., 2018).

Ранее считалось, что апоспорический апомейоз редко встречается у растений из рода *Boechea*, однако в ряде сообщений он был описан у нескольких видов. Подавляющее большинство апоспорических зародышевых мешков развивалось по типу *Hieracium* (Crane, 2001). Половая MMC в этом случае может дегенерировать или подвергнуться мейозу, как это наблюдалось в редких случаях у *B. microphylla* (Carman, 2007; Mateo de Arias, 2015; Carman: <https://reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/1000552-cytological-and-molecular-characterizations-of-reproduction-in-sexual-and-apomictic-boechea-brassicaceae.html>). Кроме того, у гибридов *B. retrofracta* × *stricta* изредка наблюдалась диплоспория *Antennaria* типа (Crane, 2001). Методом FCSS было показано, что процент зрелых половых семян (по отношению к апомиктическим семенам) у всех исследованных

апомиктов был значительно ниже, о чем также свидетельствовало и количество морфологически нормальных мейотических тетрад по отношению к апомиктическим семязачаткам, включающим в себя только нередуцированные диады. Это означает, что мейоз в большинстве случаев протекает аномально, в результате чего семена становятся нежизнеспособными, а апомиксис обнаруживается в большинстве случаев (Mateo de Arias, 2015).

У большинства апомиктов развитие пыльцы происходит нормально. Однако у некоторых видов *Boechera* при микроспорогенезе также может происходить апомейоз (Böcher, 1951; Taşkin et al., 2009a; наши неопубликованные данные). У триплоидных апомиктов мейоз I не может завершиться, поскольку гомологичные хромосомы не могут правильно конъюгировать на стадии пахитены. Хромосомы мигрируют к противоположным полюсам микроспороцита (PMC- pollen mother cell) и деконденсируются. После цитокинеза диада, в отличие от мейотической тетрады, окружена каллозной стенкой. Хромосомный синяпсис с образованием би- и тривалентов в метафазе I встречается у *B. holboellii* s. l., тогда как у *B. gunnisoniana* апомейоз полностью асиняптичен. Изучение микроспорогенеза у апомиктических триплоидов *B. holboellii* s.l. и *B. gunnisoniana* показало, что у триплоидов большинство пыльцевых зерен нередуцировано, поскольку сформировано за счет апомейотических диад (98% у *B. holboellii* s. l., 90% у *B. gunnisoniana*), а остальная часть пыльцы сформирована за счет (частично аномального) мейоза, в результате чего образуются тетрады или триады микроспор (Taşkin et al., 2009a), а иногда даже монады у триплоидных *B. holboellii* s.l. (Böcher, 1951). У диплоидных апомиктов вариабельность апомейоза выше. В различных линиях комплекса *B. holboellii* схождение хромосом и кроссинговер могут протекать нормально в пахитене (в некоторых линиях), что приводит к возникновению редуцированной пыльцы, либо, в некоторых линиях, могут образовываться триваленты и даже четырехваленты. В ряде линий наблюдалось преимущественно диплоидная пыльца, а в других – как гаплоидная, так и диплоидная пыльца (Kantama et al., 2007; Taşkin et al., 2009a; Kirioukhova et al., 2018). Фактически, было замечено, что как диплоидные, так и триплоидные

апомикты могут производить редуцированную и нередуцированную пыльцу в различных пропорциях (Böcher, 1951; Voigt et al., 2007; Taşkin et al., 2009a; Aliyu et al., 2010; Voigt-Zielinski et al., 2012; Brukhin et al., 2019).

Таблица 22 - Способы размножения линий *B. holboellii s. l.* (на основании цитоэмбриологического исследования семязачатков и FCSS) (Naumova et al., 2001).

Линия	Развитие женского гаметофита (на основе цитоэмбриологических данных)			Развитие семени (FCSS)		
	# растений	# семязачатков	% апомейоза		# растений	Значение С зародыша: эндосперма (# семян)
			Среднее	Диапазон		
Колорадские, триплоиды	4	671	98	95-100	4	3С:9С(40) ^a 3С:6С(5) ^b
Гренландские, диплоиды	16	462	73	45-89	5	2С:6С(55) ^a 2С:4С(1) ^b 4С:6С(1) ^c
Гренландские, триплоиды	4	513	94	83-98	2	3С:9С(21) ^a 3С:6С(1) ^b 6С:9С(1) ^c

^a Нередуцированный зародышевый мешок (ES), партеногенетический зародыш и псевдогамное развитие эндосперма (оплодотворение центральной клетки нередуцированной пыльцой);

^b Нередуцированный ES, партеногенетический зародыш и автономное развитие эндосперма.

^c Нередуцированный ES и двойное оплодотворение нередуцированной пыльцой.

При половом размножении растений из рода *Boechera* происходит двойное оплодотворение, тогда как у апомиктов имеет место только оплодотворение полярных ядер центральной клетки. Однако в редких случаях может встречаться и полностью автономный апомиксис (Matzk et al., 2000; Naumova et al., 2001), который чаще наблюдается у триплоидов (с частотой до 15 %), чем у диплоидов (с частотой не более 1,33 %) (Aliyu et al., 2010). Очень редко может происходить и образование зародышей с удвоенным набором хромосом в результате слияния нередуцированных мужских и женских гамет (Naumova et al., 2001). Важным выводом исследований по скринингу семян методом проточной цитометрии (FCSS, англ. Flow Cytometry Seed Screening) было заключение, что у апомиктов ткани зрелых семян произошли от нередуцированных женских и мужских гамет

(Naumova et al., 2001) (табл. 22; 23, рис. 59, 60). У апомиктов ploидность эндосперма варьирует в зависимости от ploидности спермиев, хотя наиболее распространенным является соотношение 2 материнских: 1 отцовскому (2m: 1p) геному. Существуют и исключения, хотя и при более низких частотах, что указывает на некоторую степень гибкости или, по крайней мере, на то, что система является «растекающейся» («leaky», Aliyu et al., 2010).

Таблица 23 - Количественная оценка результатов скрининга семян методом проточной цитометрии, FCSS.

Линия	Половые семена	Апомиктичные семена	
	зародыш 1n+1n эндосперм 2n+1n	зародыш 2n эндосперм 4n+2n	зародыш 2n эндосперм 4n+1n
<i>B. stricta</i>	8	0	0
M4B	-	24	0
ES517	-	250	0

Крупномасштабный FCSS скрининг, включающий в себя 16 видов *Boechera* выявил широкую вариабельность способа репродукции у диплоидных растений, от облигатного полового до почти облигатного апомиктического. Путем оценки процента апомейоза, образования половых и партеногенетических зародышей, а также полового, псевдогамного и автономного развития эндосперма было показано, что все исследованные факультативные апомикты, принадлежащие к одному генотипу, имели либо очень низкий (1–3%), либо очень высокий (87–99%) процент апомейоза, а особей с промежуточными частотами не наблюдалось. Кроме того, все триплоиды имели облигатный апомейоз. Генотип-специфическая корреляция между апомейозом, с одной стороны, и партеногенезом в сочетании с псевдогамным или автономным развитием эндосперма, с другой, показала, что частота последних никогда не превышала частоту апомейоза (Aliyu et al., 2010). Это может свидетельствовать о тесной взаимосвязи их генетического контроля и ключевой роли апомейоза на всех последующих стадиях апомиктического развития.

В наших исследованиях анализа ploидности зрелых семян (рис. 59C, D, таб. 23) половой *B. stricta* и апомиктической линии M4B, природного гибрида *B. stricta*, методом проточной цитометрии FCSS у *B. stricta* были обнаружены пики зародыша 2C и 4C и пики эндосперма 3C и 6C, что соответствует половому развитию семени ($1n+1n$ для зародыша и $2n+1n$ для эндосперма) (рис. 59A). Семена линии M4B обнаружили пики зародыша 2C и 4C, а также пики эндосперма 6C и 12C (рис. 59B), соответствующие диплоспорическому апомиксису с псевдогамным развитием эндосперма ($2n + 0n$ для зародыша и $4n + 2n$ для эндосперма).

Проведенный нами анализ ploидности семян линии ES517, с пенетрантностью апомиксиса свыше 98% (рис. 60, таб. 23), показал, что зародыши являются диплоидными (2C), а эндоспермы гексаploидными (6C) на стадии клеточного цикла G1. Это свидетельствует о том, что формирование яйцеклетки происходит без редукции хромосом путем апомейоза с последующим партеногенетическим развитием диплоидного зародыша (2C). Образование эндосперма псевдогамное, при котором происходит оплодотворение центральной клетки, состоящей из слившихся нередуцированных полярных ядер ($2C + 2C$), нередуцированным спермермием (2C). Пики 4C и 12C возникают за счет клеток зародыша и эндосперма, находящимся на стадии клеточного цикла G2, либо благодаря эндорепликации, встречающейся у апомиктов.

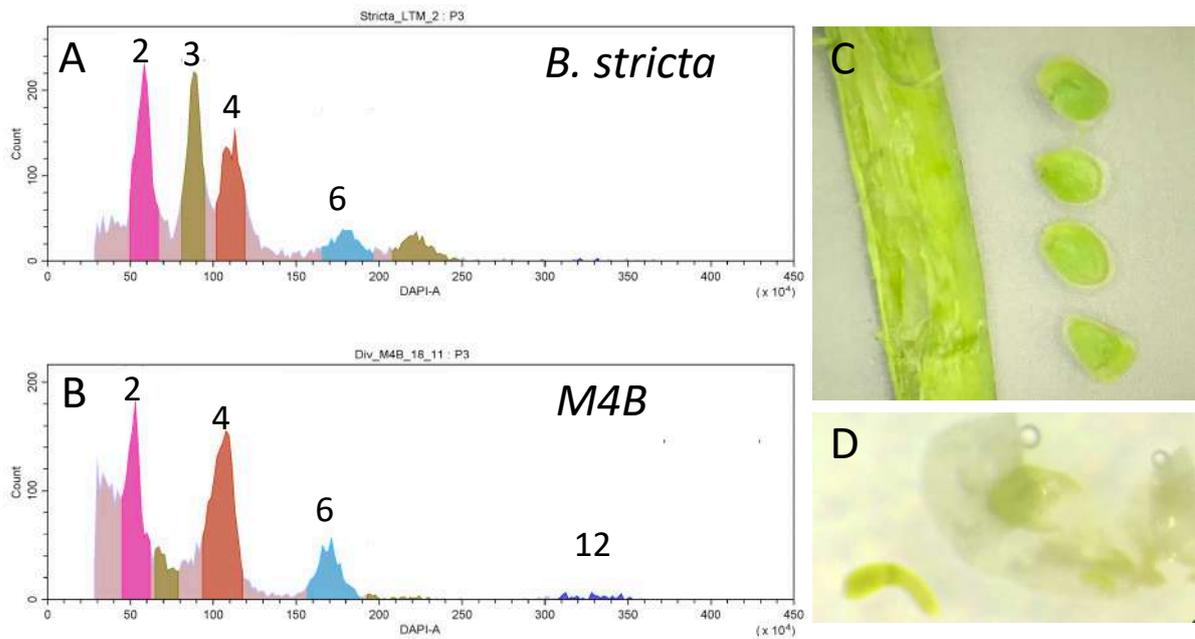


Рисунок 59 - Скрининг плоидности семян половой *B. stricta* и апомиктической линии М4В методом проточной цитометрии. (А) Гистограмма плоидности *B. stricta*, показывающая пики зародыша (2С и 4С) и пики эндосперма (3С и 6С), что соответствует половому развитию семени ($1n+1n$ для зародыша и $2n+1n$ для эндосперма). (В) Типичный пример гистограммы плоидности семян апомиктического природного гибрида *B. stricta*, М4В, демонстрирующий пики зародыша (2С и 4С) и пики эндосперма (6С и 12С), соответствующие диплоспорическому апомиксису с псевдогамным развитием эндосперма ($2n + 0n$ для зародыша и $4n + 2n$ для эндосперма). (С) Изображение семян, использованных для скрининга плоидности, которые во время сбора находились на стадии зрелости (D).

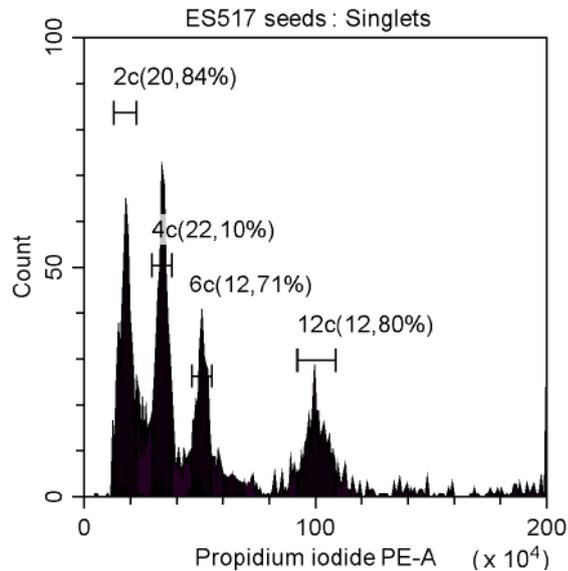


Рисунок 60 - Скрининг семян *B. divaricarpa* (апомиктическая линия ES517) с помощью проточной цитометрии (FCSS). Гистограмма плоидности, показывающая пики зародыша 2с и 4с, пики эндосперма 6с и 12с. Пики 4с и 12с возникают благодаря эндорепликации зародыша и эндосперма соответственно.

6.2.4 Популяционно-генетические исследования рода *Boechea* в отношении апомиксиса

Апомиктические и половые линии из рода *Boechea* могут скрещиваться между собой (Schranz et al., 2005; Alexander et al., 2013). Можно ожидать, что различные эволюционные силы будут воздействовать на эволюцию родословных, различающихся по способам репродукции. В половых линиях рекомбинация увеличивает вероятность элиминации вредных мутаций (эффект Хилла-Робертсона, Hill, Robertson, 1966; Felsenstein, 1974). Апомиктические линии, напротив, воспроизводятся бесполом путем, не сопровождающимся генетической рекомбинацией; таким образом, они не могут восстанавливать адаптивные аллели, если в этих аллелях происходят вредные мутации (Charlesworth, 2008). Следовательно, можно ожидать накопление вредных аллелей, явление, известное как храповик Мюллера (Muller, 1964; Charlesworth, Charlesworth, 1997).

Относительно недавние сравнительные исследования апомиктических и половых линий видов *Boechnera* подтвердили эти популяционно-генетические ожидания (Lovell et al., 2013, 2014, 2017). Lovell et al. (2017) использовали апомиктические и половые популяции *B. spatifolia* для изучения закономерностей нуклеотидной изменчивости при обоих способах репродукции с помощью полногеномного секвенирования. Они обнаружили повышенное разнообразие последовательностей и гетерозиготность вместе с высоким накоплением мутаций в апомиктических популяциях (Lovell et al., 2017). Аналогичным образом, в более масштабном исследовании 37 естественных популяций четырех видов *Boechnera* (*B. stricta*, *B. retrofracta*, *B. polyantha* и *B. pendulocarpa*), микросателлитные маркеры показали ту же тенденцию (Lovell et al., 2013): у апомиктов был обнаружен более высокий уровень гетерозиготности по сравнению с половыми видами, независимо от уровня ploидности апомикта (Brukhin et al., 2019). Похожие результаты показали и наши полногеномные исследования половых видов *B. stricta*, *B. retrofracta* и апомиктических линий ES517 и M4B, которые будут обсуждены ниже в этой главе (Kliver et al., 2018; Brukhin et al., 2019).

В апомиктических линиях эволюция происходит как за счет генетического дрейфа, так и за счет естественного отбора (Charlesworth, Wright, 2001; Glémin et al., 2006; Brukhin, Baskar, 2019). Более низкая эффективность отбора, ожидаемая в апомиктических линиях, приводит к повышенному риску вымирания апомиктов из-за накопления вредных аллелей и неспособности адаптироваться к изменениям окружающей среды (Darlington, 1958; Muller, 1964; Bengtsson, 2009; Brukhin, Baskar, 2019). Вопреки этим ожиданиям, род *Boechnera* весьма разнообразен и включает несколько апомиктических линий (Alexander et al., 2013). Вероятным объяснением выживания этих линий у *Boechnera* является внутри- и межвидовой поток генов в границах рода (Böcher, 1951; Sharbel, Mitchell-Olds, 2001; Dobeš et al., 2004a,b; Schranz et al., 2005; Beck et al., 2012; Lovell et al., 2013, 2017; Schilling et al., 2018). Поток генов в основном идет от половых растений к апомиктам, в то время как апомикты способны производить редуцированную пыльцу, которая может опылять половые линии и передавать доминирующий фактор (факторы),

вызывающий апомиксис. Взаимный поток генов между апомиктическими и половыми линиями может привести к интрогрессии адаптивных аллелей из половых в апомиктические линии, как утверждают Van Dijk et al. (2009) для видов *Taraxacum spp.* Более того, апомиксис у *Boechera spp.* является факультативным, при котором разные особи могут производить как половое, так и апомиктическое потомство (Schranz et al., 2005; Aliyu et al., 2010). Вероятных случаев сексуальности у апомиктов может быть достаточно для их очищения от вредных мутаций и восстановления приспособленности этих линий, что обеспечивает их эволюционное выживание (Van Dijk et al., 2009).

Различия в силе естественного отбора, действующего на половые и апомиктические популяции *B. spatifolia*, были описаны Lovell et al. (2014). Авторы проанализировали градиенты отбора, сопоставив средние значения генотипических признаков с измерениями относительной приспособленности, и обнаружили снижение силы адаптивной эволюции у апомиктических по сравнению с половыми линиями. Апомиктические линии имели относительно меньше количественных и молекулярно-генетических различий между популяциями, чем половые. Кроме того, дивергенция между апомиктическими популяциями не коррелировала с вариациями окружающей среды и, наоборот, структура генома и количественные признаки половых линий сильно коррелировали с широтой, климатическими изменениями и высотой над уровнем моря (Lovell et al., 2014). Обычный полевой эксперимент показал, что время цветения подвергалось строгому отбору в высокогорных местах. Это согласуется с исследованиями, проведенными на *B. stricta* (Anderson et al., 2011a), которые обнаружили, что время цветения подвергается направленному отбору в экспериментах с использованием рекомбинантных инбредных линий в условиях как лабораторных, так и полевых экспериментов.

В ряде исследований оценивалась генетическая динамика и степень естественного отбора в популяциях *Boechera*. Более ранние исследования по популяционной динамике половых видов *B. fecunda* (Song, Mitchell-Olds, 2007) и *B. stricta* (Song et al., 2009) с использованием данных о последовательностях

нескольких ядерных локусов и микросателлитов выявили сходные уровни полиморфизма и популяционной дифференциации у обоих видов, несмотря на выраженное различие между широко распространенным видом *B. stricta* и исчезающим *B. fecunda* с сокращающимся ареалом. Точно так же исследования, сравнивающие широко распространенные виды *B. stricta* и *B. latifolia* с редкими видами *B. crandallii* и *B. vivariensis*, не обнаружили сильной связи между диапазоном ареала вида и генетическим разнообразием внутри популяции (Lovell and McKay, 2015). Однако более распространенные виды демонстрировали более высокую фенотипическую пластичность и структуру количественных признаков (Qst), в то время как редкие виды содержали более сильные признаки отбора, о чем свидетельствуют более высокие соотношения Qst:Fst, где Fst относится к индексу фиксации (Lovell, McKay, 2015). Продолжая работу Song и Mitchell-Olds (2011) по *B. fecunda*, Leamy et al. (2014) обнаружили региональную адаптацию посредством обширной количественной характеристики популяций в Монтане (США) с использованием микросателлитных маркеров. Проведенный ими анализ генетической (Fst) и количественной дифференциации признаков (Qst) показал наличие дивергентного отбора, влияющего на эффективность водопользования, и вклада региональных экологических условий в местную адаптацию. Точно так же Lee и Mitchell-Olds (2011), используя микросателлитные маркеры и фенотипический количественный анализ, продемонстрировали, что доступность воды была ключевой переменной окружающей среды, объясняющей генетическую дифференциацию между двумя основными генетическими группами *B. stricta* в восточной и западной части Северной Америки. Все эти исследования основывались на микросателлитных данных и оценках Fst, и их следует интерпретировать с осторожностью, поскольку микросателлитные маркеры не идеальны для измерения популяционной дифференциации (Balloux, Lugon-Moulin, 2002; Putman, Carbone, 2014). Так же подвергалось критике и использование Fst для измерения популяционной дифференциации (Jost, 2008; Meirmans, Hedrick, 2010; Whitlock, 2011; Jakobsson et al., 2013).

Полногеномное секвенирование и окрашивание хромосом на тех же двух основных генетических группах *B. stricta*, исследованных Lee и Mitchell-Olds (2011), выявили инверсию в группе сцепления 1 генома *B. stricta* (Lee et al., 2017). Популяции, несущие инверсию, имели более низкий полиморфизм в группе сцепления 1, более низкий показатель D Tajima и большее неравновесное сцепление, чем популяции без инверсии. Кроме того, инверсия оказала сильное влияние на время цветения почти изогенных линий в тепличных условиях. Эти результаты показали, что эта инверсия оказывает важное экологическое воздействие на виды и что естественный отбор определяет дифференциацию популяций *B. stricta* в Северной Америке (Lee et al., 2017).

Как уже отмечалось, между представителями рода *Boechnera* широко распространена гибридизация (Böcher, 1951; Sharbel, Mitchell-Olds, 2001; Dobeš et al., 2004a, b; Windham, Al-Shehbaz, 2007a, b; Brukhin et al. 2019). Сообщалось, что гибридизация происходит между большинством видов этого рода неоднократно и независимо (Schranz et al., 2005; Alexander et al., 2013). Самые ранние молекулярные доказательства, подтверждающие гибридизацию, получены на основе анализа данных ITS (внутренний транскрибируемый спейсер, англ. Internal transcribed spacer) и последовательностей хлоропластов, а направление потока генов между видами, теперь известными как *B. stricta* и *B. retrofracta*, был определен филогеографическим анализом (Dobeš et al., 2004a, b). Следует отметить, что выводы о гибридной природе особей, основанные на одном локусе или на геноме органелл, могут неточно отражать историю клады или популяции (Doyle, 1992; Maddison et al., 2006). Однако Schranz et al. (2005) провели обширные эксперименты по скрещиванию, показав, что успешные скрещивания возможны среди нескольких представителей рода. Это указывает на отсутствие внутренних барьеров репродуктивной изоляции и, следовательно, на возможность обширного потока генов между различными видами *Boechnera*.

До сих пор микросателлитные маркеры играли центральную роль в идентификации видов и предполагаемых гибридов рода *Boechnera* (Li et al., 2017). Beck et al. (2012) изучали особи *Boechnera*, используя набор из 13 микросателлитов.

Гибриды между *B. fendleri* × *B. stricta* и *B. retrofracta* × *B. stricta* были выявлены с использованием этой методологии (Beck et al., 2012). Применяя аналогичные методы, Lovell et al. (2013) изучили 231 особь из 37 природных популяций четырех видов *Boechea* (*B. stricta*, *B. retrofracta*, *B. polyantha* и *B. pendulocarpa*). Они пришли к выводу, что все триплоидные особи были апомиктическими гибридами. Это не относится к диплоидным апомиктическим линиям, которые вели себя как настоящие виды, а не гибридные особи. На основании этих результатов сделан вывод, что гибридизация является косвенным коррелятом апомиксиса рода *Boechea*.

С появлением технологий секвенирования нового поколения идентификация гибридов стала более корректной и точной. Используя полногеномное секвенирование *B. spatifolia*, Lovell et al. (2017) выясняли, имеют ли апомиктические популяции гибридное происхождение или нет. Анализ 22 000 филогенетических деревьев на основе гаплотипов генома показал гибридное происхождение апомиктических линий *B. spatifolia*. Аналогичное было выявлено нами у апомикта М4В, в котором геном состоял из гапломов половой *B. stricta* и половой *B. retrofracta*, при этом 6 хромосом происходили от *B. stricta*, а 9 хромосом от *B. retrofracta*. В другом исследовании с использованием методов генотипирования путем секвенирования Schilling et al. (2018) оценили геномную изменчивость у 79 особей из восьми видов *Boechea*. Анализ генетического смешивания позволил точно идентифицировать гибридные особи. Это исследование предоставило доказательства недавних и древних генетических смешиваний и вариаций этих смешиваний между видами.

6.2.5 Наследование и генетические аспекты апомиксиса у представителей рода *Boechea*

Одной из уникальных особенностей апомиксиса у представителей из рода *Boechea* является то, что он может происходить на диплоидном уровне. Диплоидные апомикты *Boechea* представляют собой высоко гетерозиготные

гибриды (Beck et al., 2012), а цитогенетические и популяционные исследования половых и апомиктических видов *Boechea* показали, что диплоидные геномы могут быть сложными (Mandáková et al., 2015; Brukhin et al., 2019). Основываясь на анализе маркеров и плоидности у различных видов *Boechea*, новая модель предполагает, что генетические факторы апомейоза возникают независимо. Особь, с апомейозом только по женской линии, будет стабильно генерировать семена с зародышем 2С и эндоспермом 5С путем самоопыления редуцированной пылью. Другие особи могут иметь апомейоз только по мужской линии и производить семена различной плоидности. Редуцированная пыльца от апомиктических по женской линии особей позволяет скрещивание с половыми особями, что способствует распространению фенотипа. В итоге, со временем особи с апомейозом как по женской, так и по мужской линиям скрещиваются, что приводит к возникновению стабильных диплоидных семян с нередуцированными мужскими и женскими гаметами и с зародышем 2С и эндоспермом 6С. Такие диплоидные апомикты, также производящие фертильную нередуцированную пыльцу, способны оплодотворять половые диплоиды, что может привести к образованию триплоидных апомиктов (Lovell et al., 2013).

Окраска метафазных хромосом с помощью геномной гибридизации *in situ* показала, что все исследованные апомиктические линии имеют признаки гибридного происхождения. Все они оказались аллополиплоидами с разным числом хромосом, унаследованным от *B. holboellii s.l.* или *B. stricta*. На структуру их хромосом сильно повлияли последствия гибридизации, приведшие к анеуплоидии, и замене гомеологичных хромосом (Kantama et al., 2007; Mandáková et al., 2015; Soltis et al., 2023). Следовательно, апомиктические виды *Boechea* не являются однозначными диплоидами, а имеют полигаплоидное происхождение (Соколов и др., 2011). Следует отметить, что упомянутые цитогенетические данные не исключают возможности существования истинных диплоидов среди *Boechea spp.*, хотя и ставят это под сомнение. Было высказано предположение, что наследование признаков, ассоциированных с апомиксисом, связано с дополнительными гетерохроматическими хромосомами *Het*, *Het'* и *Del*,

обнаруженными у апомиктических диплоидов (Kantama et al., 2007; Mandáková et al., 2015). Согласно Kantama et al. (2007), все исследованные диплоидные апомиктические линии имели не менее четырех хромосом от *B. stricta*, включая *Het* и *Del*, а сочетание этих хромосом могло иметь значение для проявления признаков апомиксиса.

Исследования показали, что хромосома *Het* является измененным гомологом первой хромосомы *B. stricta*, в которой произошло накопление перицентромерного гетерохроматина, а пара *Het'+Del* является результатом разрыва *Het* с последующей перицентрической инверсией в *Het* хромосоме (Mandáková et al., 2015). Согласно более ранним данным, в некоторых линиях *Del* могла возникнуть в результате транслокации и слияния проксимального сегмента хромосомы *B. stricta* с дистальным сегментом хромосомы *B. holboellii s. l.* (Kantama et al., 2007). Однако гибридизация половых и апомиктических линий *Boechea* не давала апомиктического потомства, несмотря на наследование *Het*-хромосомы (Schranz et al., 2006a). При скрещивании половых диплоидов *B. stricta* с апомиктическими аллодиплоидами *B. divaricarpa*, несущими *Het*-хромосому, потомство F1 было триплоидным и имело низкую фертильность, но не было апомиктическим, несмотря на наличие *Het*-хромосомы. Популяция F2 демонстрировала различные уровни плоидности и числа хромосом, а также столь же низкую плодовитость, как и потомство F1. Несколько особей F3, по-видимому, сохранили высокую плоидность своих родителей, а фертильность увеличилась по сравнению с их предками в F1 и F2, но не достигла уровня особей, использованных в исходном скрещивании. В любом случае апомиктического потомства не было. Таким образом, генетический контроль апомиксиса у *Boechea spp.* не ограничивается наследованием aberrантных хромосом (Schranz et al., 2006a).

У многих филогенетически отдаленных апомиктов, как двудольных, так и однодольных, обнаружены хромосомные участки с подавленной рекомбинацией около локусов, связанных с апомиксисом, часто в гемизиготном состоянии и обогащенные повторяющимися последовательностями и транспозонами (Grossniklaus et al., 2001; Ozias-Akins et al. al., 2003; Van Dijk et al., 2009; Okada et

al., 2011; Kotani et al., 2014; Брюхин, 2017). Предполагается, что такая рекомбинационно инертная область может содержать несколько сцепленных генов с разными функциями, синергетические эффекты которых могут приводить к апомиктическому развитию. Однако у многих апомиктов локусы, контролирующие разные компоненты апомиксиса, находятся в разных областях генома. У *Boecheera spp.* наиболее вероятными кандидатами на наличие таких локусов являются абберрантные хромосомы *Het*, *Het'* и *Del*. Принимая во внимание, что гибридогенная природа апомиктов *Boecheera* является механизмом, запускающим возникновение и последующую эволюцию таких рекомбинационно инертных блоков, несущих гены, связанные с апомиксисом, гибридизация видов с неполной хромосомной гомологией могла привести к образованию нерекомбинантных, гемизиготных участков из которых и возникли такие блоки (Sharbel et al., 2010).

О механизмах, которые контролируют апомиксис, выдвинуты несколько теорий. Согласно гипотезе главного регулятора, мутация гена, предшествующего регуляторному каскаду, может привести к апомейозу, партеногенезу и/или автономному развитию эндосперма (Koltunow, Grossniklaus, 2003) либо к накоплению мутаций в области с низкой рекомбинацией для каждого аспекта апомиксиса, как показано у некоторых из вышеупомянутых апомиктических видов. У арабидопсиса были идентифицированы различные мутанты с апомейотическим фенотипами (Schmidt et al., 2015; Brukhin et al., 2011). Они, по-видимому, делятся на регуляторы клеточного цикла и основных генов мейоза (Ravi et al., 2008; d'Erfurth et al., 2009, 2010; Zhao et al., 2017), а также на гены, участвующие в биосинтезе малых РНК (мРНК) (Olmedo-Monfil et al., 2010; Schmidt et al., 2011).

Несмотря на то, что мутанты у *Boecheera* еще не изучены, были идентифицированы два локуса, которые коррелируют с женским и мужским апомейозом. *APOMixis Linked LOcus (APOLLO)*, который кодирует экзонуклеазу Asp-Glu-Asp-Asp-His, его экспрессия подавляется в половых семязачатках, когда они вступают в мейоз, и активируется в апомейотических семязачатках (Corral et al., 2013; Vakin et al., 2022). *APOLLO* демонстрирует биаллельное наследование с «апо-» и «секс-» аллелями. Эти аллели отличаются 20-нуклеотидным

полиморфизмом в 5'-нетранслируемой области гена экзонуклеазы. Все исследованные до сих пор апомиктичные линии *Boechea* были гетерозиготными по аллелям *APOLLO*, имеющими по крайней мере одну апо-аллель и одну секс-аллель, в то время как все половые генотипы гомозиготны по секс-аллелям (Corral et al., 2013). Мужским аналогом *APOLLO* является локус *Unreduced Pollen GRAin Development2* (*UPGRADE2*), который экспрессируется исключительно в материнских клетках пыльцы (PMC) апомиктических видов. Он кодирует химерную длинную не кодирующую РНК (днкРНК), способную образовывать стабильные вторичные структуры. *UPGRADE2* возник в результате дупликации *UPGRADE1* с последующей вставкой функционального гена и дальнейшей экзонизацией, что сделало его транскрипционно активным (Mau et al., 2013). Существует высокая корреляция между наличием этих ассоциированных с апомиксисом локусов и апомиктическим способом размножения (98,4% для *APOLLO*, 96% для *UPGRADE2* у 275 линий *Boechea* из 22 видов), хотя было также обнаружено, что у половых особей 2,27 % имели апо-аллель *APOLLO* и 34,48% *UPGRADE2*. Таким образом, хотя *APOLLO* является наиболее подходящим диагностическим индикатором апомиксиса у различных видов и линий *Boechea* (Mau et al., 2015), его функция для размножения еще не выяснена. Независимость *APOLLO* и *UPGRADE2* согласуется с популяционно-генетическими исследованиями, которые показали, что апомейоз по мужской и женской линии наследуются независимо, хотя обычно они коррелируют друг с другом на популяционном уровне (Lovell et al., 2013).

Проведенный нами молекулярно-генетический эволюционный анализ гена *APOLLO* с использованием метода максимального правдоподобия и интегрированного инструмента для выравнивания последовательностей MEGA7 (Kliver et al., 2018) обнаружил две дополнительные, более отдаленные копии *APOLLO*, которые могут указывать на прошлые события дупликации (рис. 61). Изучение апо- и половых аллелей *APOLLO* свидетельствует о том, что они возникли после обособления рода *Boechea* и образуют две отдельные клады. Учитывая, что *B. retrofracta* и *B. stricta* являются половыми видами, неудивительно,

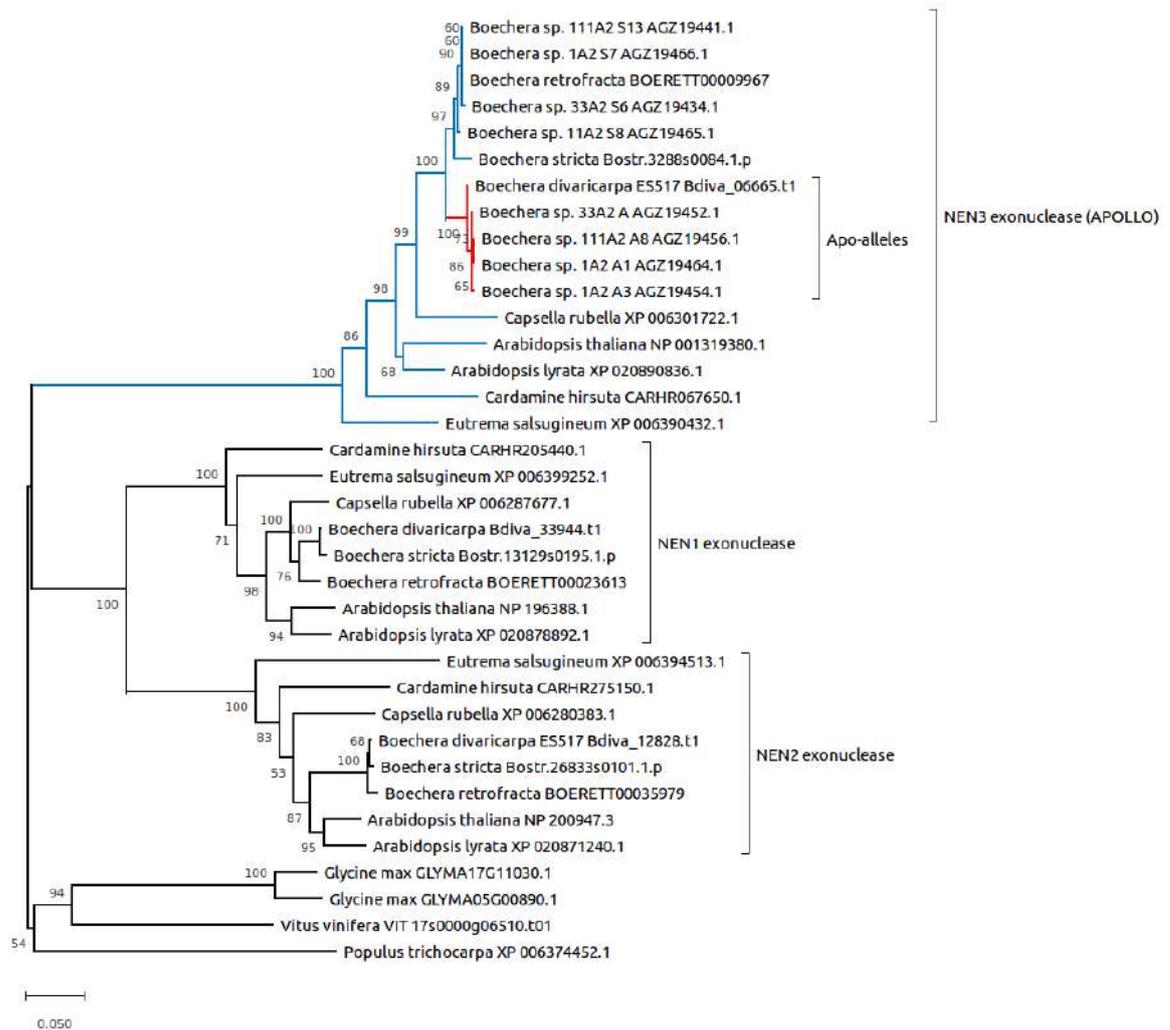


Рисунок 61 - Филогенетическое дерево изоформ локуса *APOLLO* (экзонуклеаза NEN) аллелей локуса *APOLLO* апомиктических видов *Boecheera* из Corral et al (2013). В качестве внешней группы использовали последовательности *Populus trichocarpa*, *Vitus vinifera* и *Glycine max*. Клада, относящаяся к локусу *APOLLO*, изображена синим цветом, а апо-аллели выделены красным. Числа рядом с узлами представляют соответствующую бутстрап поддержку. Наряду с точной копией локуса *APOLLO* мы наблюдали две другие, более отдаленные копии. Все геномы Brassicaceae, используемые в исследовании также несли эти три копии, связанные с кластерами ортологичных генов ENOG410BURN (локус *APOLLO*), ENOG410BUTR и ENOG410C333 из базы данных EggNOG. Мы провели поиск этих ортологов у других видов и реконструировали филогенетическое дерево (Kliver et al., 2018).

что они несут половые аллели *APOLLO* (Kliver et al., 2018). Мы предложили эволюционный сценарий, при котором после трипликации, вероятно имевшей место до разделения Brassicaceae, одна из копий *APOLLO* могла приобрести новую функцию у общего предка видов *Boecheira*, что привело к выделению апомиктических линий. Соотношение Ka/Ks (отношение количества несинонимичных замен (Ka) к количеству синонимичных замен (Ks) за тот же период) аллелей *APOLLO* свидетельствует о том, что ветвь, ведущая к апо-аллелям, находится под положительным отбором ($Ka/Ks = 1,4646$), что характерно для паралогов, приобретших новую функцию (рис. 61).

Экспрессионный анализ апо- и секс-аллелей *APOLLO* у апомиктических и половых растений *Boecheira* будет рассмотрен в разделе 6.3.

Также высказывалось предположение, что в основе возникновения апомиксиса лежат эпигенетические изменения регуляции генов. На *A. thaliana* было продемонстрировано, что полиплоидизация, возникающая после межвидовой гибридизации приводила к резким изменениям экспрессии генов (Lee, Chen, 2001), что делает ее подходящим унификатором как гипотезы гибридизации, так и гипотезы генных мутаций, при этом, по-видимому, эпи-аллели, а не мутантные аллели играют начальную роль в

дерегулировании в пространстве и во времени экспрессии генов, ответственных за репродукцию (Grimanelli et al., 2001; Grossniklaus, 2001; Spillane et al., 2001; Koltunow, Grossniklaus, 2003; Brukhin et al., 2019; Brukhin, Albertini, 2021). Малые РНК вовлечены в эпигенетическое перепрограммирование во время гаметогенеза и событий после оплодотворения (Martinez, Köhler, 2017). Среди генов, участвующих в метаболизме миРНК в семязачатках, был обнаружен ген *AGO9*, который взаимодействует с 24-нуклеотидными миРНК, полученными от мобильных элементов. Пока неясно, обусловлен ли апомейотический фенотип мутантов *ago9* отсутствием сайленсинга мобильных элементов или является следствием других воздействия миРНК, которые взаимодействуют с *AGO9* (Vielle-Calzada et al., 2012). Профилирование экспрессии миРНК у *Boecheira* выявило специфичные для *Boecheira* консервативные миРНК и микросателлитоподобные РНК (мисРНК),

многие из которых имеют потенциальные сайты связывания в экзонах, причем большинство их мишеней являются регуляторными факторами. Было высказано предположение, что количественные различия в связывании мисРНК с мишенями являются результатом полиморфизма длины микросателлитов либо их предшественников, либо генов-мишеней, что может быть причиной разницы транскриптомов при регуляции генов у половых и апомиктических видов (Amiteye et al., 2013). Такая разница наблюдалась не только у апомиктических линий *Boechnera* по сравнению с половыми, но также и в семязачатке апомиктов значительно преобладала активность факторов транскрипции по сравнению с остальными органами растения (Sharbel et al., 2010; Schmidt et al., 2014), кроме того, существенно отличалась регуляция основного клеточного цикла, метаболизм мисРНК (Schmidt et al., 2014) и наблюдались гетерохронические различия в импринтированных генах (Sharbel et al., 2010). Более подробно роль эпигенетической регуляции при репродукции будет рассмотрена в главе 7.

Хотя гены, контролирующие компоненты апомиксиса у *Boechnera spp.* еще не идентифицированы, существующие данные о наследовании апомиксиса и о локусах, связанных с апомиксисом, обеспечивают ценную отправную точку для дальнейших исследований. В конечном счете необходимы дальнейшие функциональные исследования генов-кандидатов и дополнительная разработка экспериментальных инструментов для такого анализа. Используя биоинформатические инструменты, для поиска различий мы сравнивали гены апомиктов, содержащие "апомиктические" k-меры и осуществляли поиск их гомологов во всех доступных видах из рода *Boechnera*. По отличию фланкирующих повторов у половых и апомиктических видов мы идентифицировали гены, ассоциированные с апомиксисом, краткие результаты этих исследований представлены в разделе 6.7.

6.3 Анализ экспрессии ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* и *APOLLO* у половых и апомиктических видов *Boechea*

Как было отмечено выше, на сегодняшний день ген *APOLLO*, кодирующий экзонуклеазу *NEN3*, является одним из очень немногих обнаруженных генов, тесно связанных с апомиксисом у видов *Boechea*. Специфичный для центромеры вариант гистона *H3*, кодируемый геном *CENH3*, необходим для деления клеток. Мутации в *CENH3* нарушают расхождение хромосом во время митоза и мейоза, поскольку прикрепление микротрубочек веретена деления к мутантной форме гистона *CENH3* не происходит. В этом и разделе представлен экспрессионный анализ генов *APOLLO* и *CENH3* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР) в гинецее и плодах природных диплоидных апомиктических и половых видов *Boechea* на стадиях мейоза/ апомейоза, а также до и после оплодотворения. Кроме того, мы изучили *in silico* характеристики генов *APOLLO* и *CENH3*, которые возможно влияют на процесс апомиксиса, а также охарактеризовали структуру гена *CENH3* с помощью биоинформатических инструментов (Bakin et al., 2022). В то время как *CENH3* является единственной копией гена у всех видов *Boechea*, ген *APOLLO*, как отмечалось ранее, имеет несколько полиморфных аллелей, связанных с половым и апомиктическим воспроизведением у растений из рода *Boechea*. Эволюционный анализ гена *APOLLO* на основе метода максимального правдоподобия, представленный в нашем исследовании, показывает, что половые и апомиктические виды *Boechea* выделялись в разные клады на филогенетическом дереве (рис. 61). Отчасти это может быть связано с тем, что апо-аллели *APOLLO*, присутствующие в геномах апомиктических видов, могут приобретать новую функцию (Kliver et al., 2018). Проведенный анализ экспрессии *APOLLO* показал, что уровни транскриптов гена высоки во время (апо)мейоза, причем в апомиктах сильнее экспрессируются апо-аллели, а в половых только половые аллели гена. После (апо)мейоза и оплодотворения уровни экспрессии обоих аллелей резко снижаются в гинецеях как у апомиктических, так и у половых растений; однако к пятому дню после

оплодотворения экспрессия апо-аллелей у апомиктов и половых аллелей у половых растений сильно возрастала, причем в апомиктических стручках уровень экспрессии соответствующих аллелей был выше, чем в половых.

Мы также охарактеризовали ген *CENH3*, который крайне важен для клеточного деления (Lermontova et al., 2011; 2015) и может влиять на апомиктические события. Накопление белка *CENH3* обеспечивает место сборки сложного белкового комплекса, называемого кинетохорами. Основной функцией кинетохор является связывание хромосом с волокнами веретена деления во время расхождения хромосом в мейозе и митозе (Talbert, Henikoff, 2010). *CENH3* содержит два домена: ДНК-связывающий гистоновый складчатый домен (HFD, англ. Histone Fold Domain) и N-концевой домен. HFD структурно аналогичен тому же домену в гистоне H3 и является высоко консервативным у высших эукариот. Однако N-конец белка *CENH3* сильно варьирует даже среди близкородственных видов и выполняет мейоз-специфическую функцию (Maheshwari et al., 2015). Мутации на N-конце *CENH3* нарушают сегрегацию хромосом в мейозе и часто приводят к стерильности (Lermontova et al., 2011; Ravi et al., 2011). Нулевые мутации в *CENH3* также вызывают элиминацию хромосом, такие мутанты у *Arabidopsis thaliana* являются индукторами гаплоидов при скрещивании с растением дикого типа (Ravi and Chan, 2010; Karimi-Ashtiyani et al., 2015; Evtushenko et al., 2019), а хромосомы этих мутантов исчезают в развивающемся зародыше. Полученное растение содержит гаплоидный набор родительских хромосом дикого типа, количество которых можно удвоить. Исследование структуры и профили экспрессии *CENH3* у апомиктических и половых видов *Boechera* помогут лучше понять роль этого гена в расхождении хромосом при мейозе. В этой главе также обсуждается полиморфизм и филогения генов *APOLLO* и *CENH3*.

6.3.1 Характеристики гена *CENH3* и изоформ его белка

Общая характеристика гена *CENH3* и белка *CENH3* для семи исследованных видов *Boechea* представлена в табл. 24. У всех изученных видов изоформы белка *CENH3* показали высокое сходство друг с другом с индексом сходства не менее 97% (как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне). Все последовательности белка *CENH3* у *Boechea* содержали консервативный домен гистона H3/CENP-A (IPR000164), были размером 177 а.к. и, по предсказаниям, локализовались в ядре. Результаты выравнивания белка *CENH3* представлены на рисунке 62.

У семи исследованных видов *Boechea* в белке *CENH3* было обнаружено 10 полиморфных сайтов аминокислот. *B. stricta* и *B. divaricarpa*, которые в дальнейшем были подвергнуты сравнительному анализу экспрессии гена *CENH3*, наблюдались только две полиморфные аминокислоты в положениях 7 и 16 N-конца, которые расположены вне консервативного домена гистона H3.

Тепловая карта матрицы сходства *CENH3* показывает, что эти белки у всех видов *Boechea* почти идентичны (рис. 63), что согласуется с анализом выравнивания белков (рис. 62), и очень схожи с этим белком арабидопсиса ($\geq 80\%$) и большинства других изученных представителей Brassicaceae. Ген *CENH3* представлен только одной копией в геноме у каждого исследованного вида. Эволюционная история оценивалась с помощью метода наибольшего логарифмического правдоподобия.

Таблица 24 - Общая характеристика гена *CENH3* и белка CENH3 у семи рассматриваемых видов *Boechera*.

Параметр	Значение
Длина гена	2231–2298 п.н.
Количество экзонов	10
Длина белка	177 а.к.
Молекулярная масса	19,616.82 ± 60.4
Теоретическая pI	11.25 ± 0.10
Внутриклеточная локализация	Ядро
Консервативные домены	Гистон H3/CENP-A (от 57 а.к. до 172 а.к.)

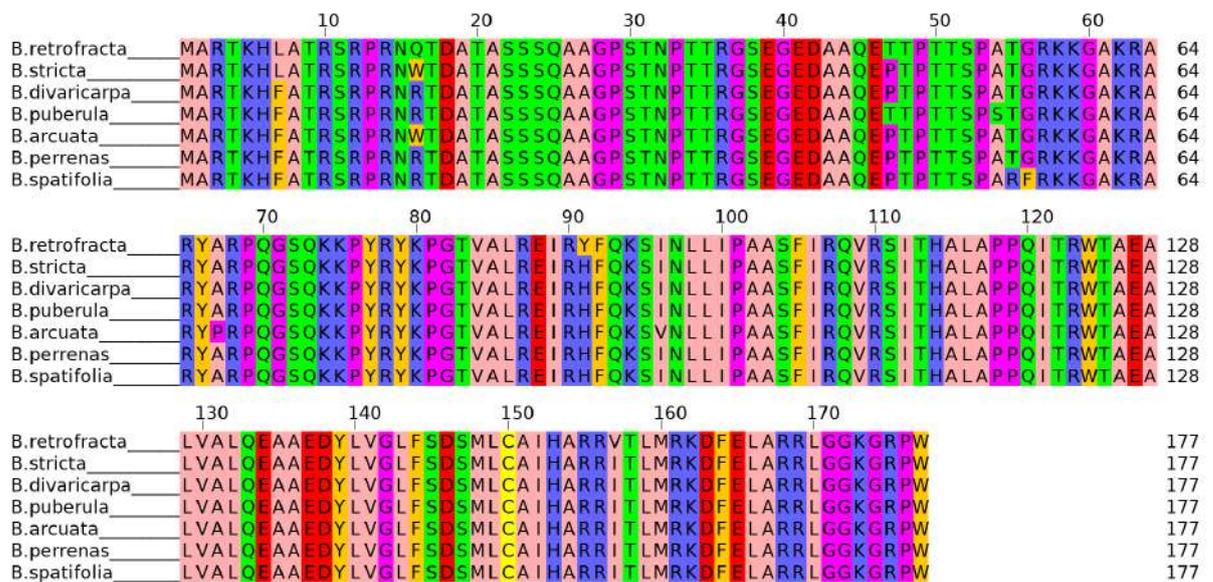


Рисунок 62 - Множественное выравнивание белков CENH3 у рассматриваемых видов *Boechera*. Множественное выравнивание было выполнено с использованием программного обеспечения MUSCLE и визуализировано в Jalview (Bakin et al., 2022).

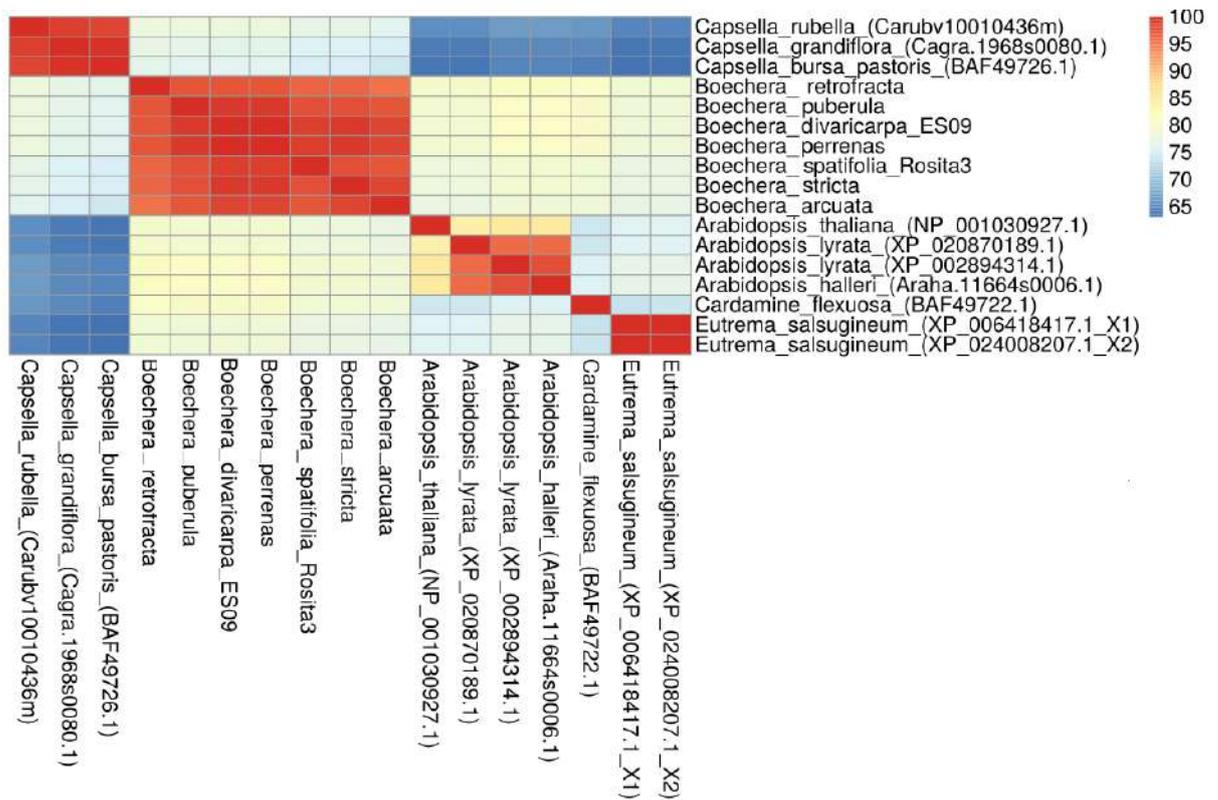


Рисунок 63 - Матрица сходства белка CENH3 у ряда видов из семейства Brassicaceae (Bakin et al., 2022).

Реконструированное филогенетическое дерево (рис. 64) было укоренено на *Capsella spp.*, которая использовалась в качестве аутгруппы. Все виды *Boechera* группировались в одну кладу, которая отделялась от *Arabidopsis spp.*, *Eutrema spp.*, *Cardamine spp.*, что в отличие от APOLLO (см. раздел 6.2.5), предполагает, что последовательности белков CENH3 не отражают способ размножения внутри видов *Boechera*.

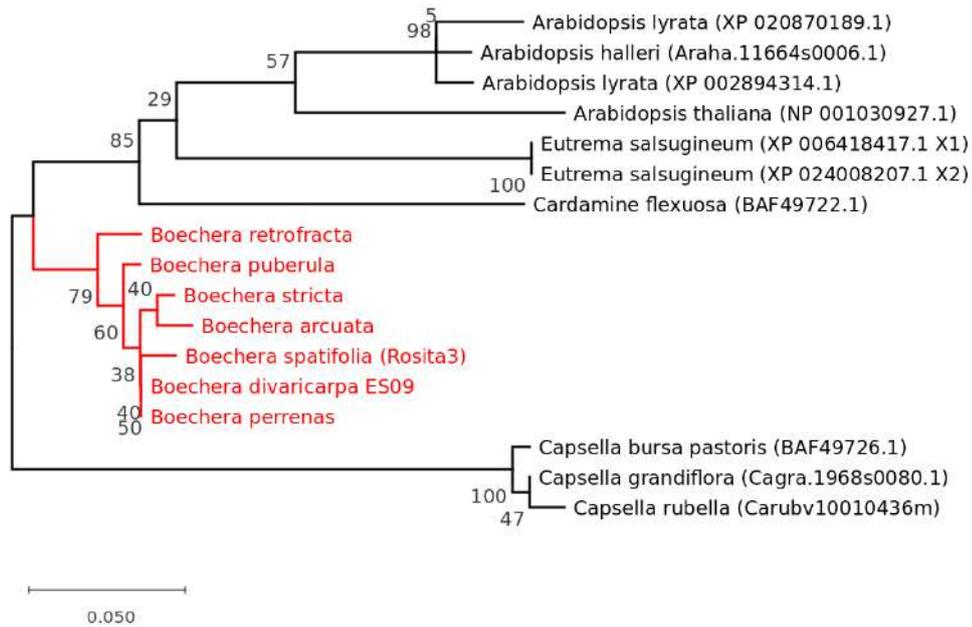


Рисунок 64 - Филогенетическое дерево *CENH3* (гистон H3-подобный центромерный белок) видов семейства Brassicaceae. Последовательности видов *Capsella* использовались в качестве внешней группы. Все виды *Boechera* группируются в одну кладу. Числа рядом с узлами представляют соответствующую бутстрап поддержку (Bakin et al., 2022).

6.3.2 Характеристика промотора гена *CENH3*

Поскольку было установлено, что геномы всех рассмотренных видов содержат только одну копию гена *CENH3*, мы решили исследовать и сравнить структуру промоторов гена у двух видов, половой *B. stricta* (*BsCENH3*) и апомиктической *B. divaricarpa* (*BdCENH3*). Для этого мы проанализировали 1000 п.н. выше первого кодона (ATG) у генов *BsCENH3* и *BdCENH3* (рис. 65). В обоих промоторах *CENH3* было обнаружено несколько регуляторных элементов и основных промоторных областей, таких как ТАТА и СААТ-бокс. Из регуляторных мотивов общими для обоих промоторов *CENH3* были сайты узнавания и связывания факторов транскрипции МУВ. Факторы транскрипции МУВ кодируются несколькими генами, которые контролируют развитие растений, дифференцировку, стрессоустойчивость и защиту от неблагоприятных факторов

(Ambawat et al., 2013). Наличие в промоторах нескольких мотивов связывания MYB может указывать на роль факторов транскрипции MYB в регуляции гена *CENH3*. Кроме того, в промоторах были обнаружены сайты связывания фактора транскрипции E2F в положении -163 обоих генов, *BsCENH3* и *BdCENH3*. В положении -115 у *BdCENH3* и *BsCENH3* содержится один полиморфный сайт (GCGGGAAA/GCGGGAAAG). Также промоторные области включали в себя несколько мотивов реакции на свет, таких как Box 4, мотив GT1 и мотив TCT. В промоторах *CENH3* обоих видов были обнаружены элементы ответа на гормоны, такие как, чувствительный к гиббереллину (GARE-мотив) и чувствительные к ауксину (TGA-элемент) элементы. Кроме того, в промоторе были найдены следующие цис-действующие регуляторные элементы: MeJA (мотив CGTCA), участвующий в реакции на низкие температуры (LTR, англ. low-temperature responsiveness), участвующий в циркадном контроле, связанный с экспрессией меристемы (CAT-box) и участвующий в экспрессии эндосперма (GCN4_motif) (рис. 65). Таким образом, наши исследования промоторных областей генов *BsCENH3* и *BdCENH3* не выявили существенных различий. Поэтому мы решили проверить уровни экспрессии генов *BsCENH3* и *BdCENH3* в гинецеях при мейозе (*BsCENH3*) и апомейозе (*BdCENH3*) и в молодых стручках сразу после оплодотворения.

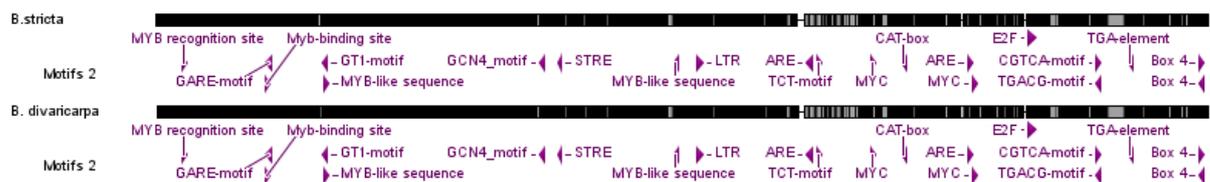


Рисунок 65 - Мотивы, обнаруженные в области 1000 п.н. выше сайта начала транскрипции генов *BsCENH3* и *BdCENH3* (Bakin et al., 2022).

6.3.3 Экспрессия *CENH3* во время и после (апо)мейоза в гинецеях, стручках и пыльниках

Мы провели сравнительный анализ экспрессии гена *CENH3* в гинецеях и пыльниках из нераспустившихся цветочных почек (до опыления) и в стручках 1–5 дней после опыления (ДПО) (рис. 66) с целью исследования динамики экспрессии гена на стадиях мейоза/апомейоза, формирования гаметофита и начала завязывания семян у диплоидного апомикта *B. divaricarpa* и диплоидного полового вида *B. stricta*. Для исследования стадий после опыления использовали только удлиняющиеся стручки с целью гарантии, что произошло опыление и началось развитие семян. Было установлено, что во время мейоза/апомейоза ген *CENH3* интенсивно экспрессируется в гинецее как половой *B. stricta*, так и апомиктической *B. divaricarpa*, при этом уровень экспрессии *CENH3* у *B. stricta* наблюдался более чем в два раза выше. Экспрессия значительно снижалась после мейоза, однако ее уровень у *B. stricta* был все же выше, чем у *B. divaricarpa* (рис. 66). В течение трех дней после опыления уровень экспрессии *CENH3* в стручках оставался низким у обоих исследованных видов. Однако на 4-й ДПО экспрессия *CENH3* значительно возрастала в стручках *B. stricta* и была более чем в 6 раз выше, по сравнению с *B. divaricarpa*, тогда как у последней уровень экспрессии практически не изменялся. Такая же тенденция сохранилась в стручках обоих видов на 5-й ДПО; однако разница между половыми и апомиктическими видами была меньше и различалась в 3,7 раза (рис. 66).

Мы также исследовали уровни экспрессии гена *CENH3* в пыльниках *B. stricta* и *B. divaricarpa* во время мейоза. Уровень экспрессии *CENH3* у *B. stricta* в тканях пыльника во время мейоза был в 1,5 раза ниже, чем у *B. divaricarpa*. К концу мейоза экспрессия *CENH3* подавлялась почти полностью в пыльниках обоих видов (рис. 66).

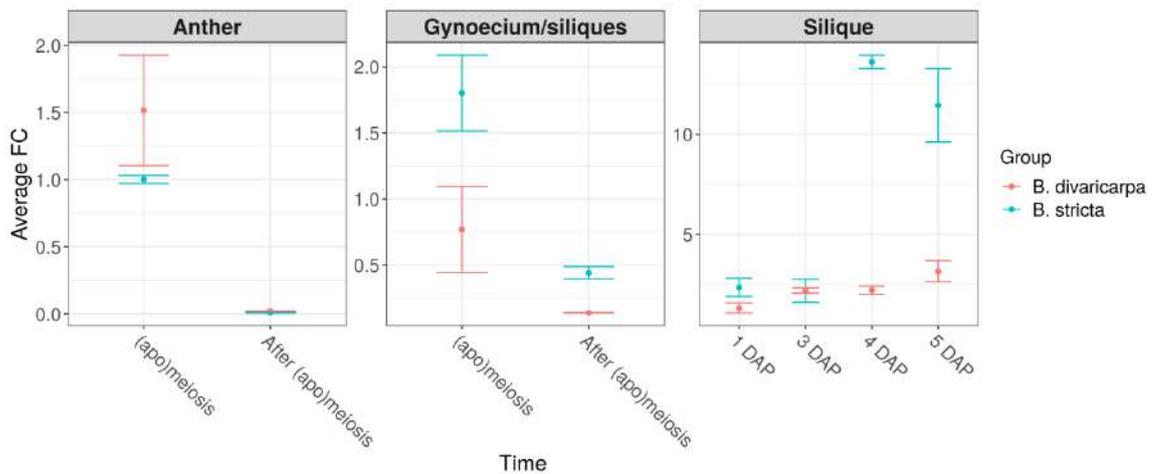


Рисунок 66 - Уровни экспрессии гена *CENH3* в пыльниках, гинецеях и молодых стручках у апомиктической *B. divaricarpa* и половой *B. stricta*. Столбцы показывают уровни изменения кратности экспрессии \pm стандартные ошибки. Дни после опыления (ДПО = DAP) (Bakin et al., 2022). Anther- пыльник; Gynoecium/siliques – гинецей/стручки; Silique – стручок. (Bakin et al., 2022).

Наблюдаемая разница в уровне экспрессии гена *CENH3* между половым и апомиктическим видом может быть связана либо с различиями в регуляции экспрессии транскрипционными факторами и генами, ответственными за их экспрессию, либо с эпигенетическими факторами, которые могут регулировать экспрессию на посттрансляционном уровне. Снижение уровня экспрессии *CENH3* во время и после мейоза в гинецеях и стручках апомиктических *B. divaricarpa* по сравнению с половыми *B. stricta* может быть одной из причин нарушения мейоза у апомиктов.

6.3.4 Экспрессия *APOLLO* во время и после (апо)мейоза в гинецеях, стручках и пыльниках

Наряду с анализом динамики гена *CENH3* мы исследовали экспрессию апо- и секс-аллелей гена *APOLLO* во время и после (апо)мейоза в гинецее и пыльниках, а также после опыления в стручках половой диплоидной *B. stricta* и апомиктической диплоидной *B. divaricarpa* 1–5 ДПО (рис. 67). Поскольку *B. stricta* не имеет апо-аллели в своем геноме, мы использовали ее в качестве отрицательного контроля. В апомейотическом гинецее *B. divaricarpa* уровень экспрессии апо-аллели *APOLLO* был в четыре раза выше по сравнению с ее экспрессией после апомейоза. В течение четырех ДПО экспрессия апо-аллелей снижалась в стручках *B. divaricarpa* почти до нуля; однако на 5-й ДПО в ее стручках экспрессия апо-аллели резко увеличивалась, тогда как в *B. stricta*, как и ожидалось, экспрессии не наблюдалось. (рис. 67). Относительно экспрессии половой аллели было обнаружено обратное. Во время апомейоза гинецей апомиктической *B. divaricarpa* демонстрировал в 6 раз более низкую экспрессию половой аллели *APOLLO* по сравнению с половой *B. stricta*. Хотя после (апо)мейоза экспрессия половой аллели резко снижалась в гинецее обоих видов, тем не менее уровень экспрессии у *B. stricta* оставался в 6 раз выше, чем у *B. divaricarpa*. После опыления экспрессия половой аллели почти полностью снизилась в стручках обоих видов, а затем с 3-й ДПО начала постепенно возрастать до резкого подъема экспрессии на 5-й ДПО, при этом в стручках половых *B. stricta*, экспрессия была выше, чем у апомиктов *B. divaricarpa*, в 12 раз.

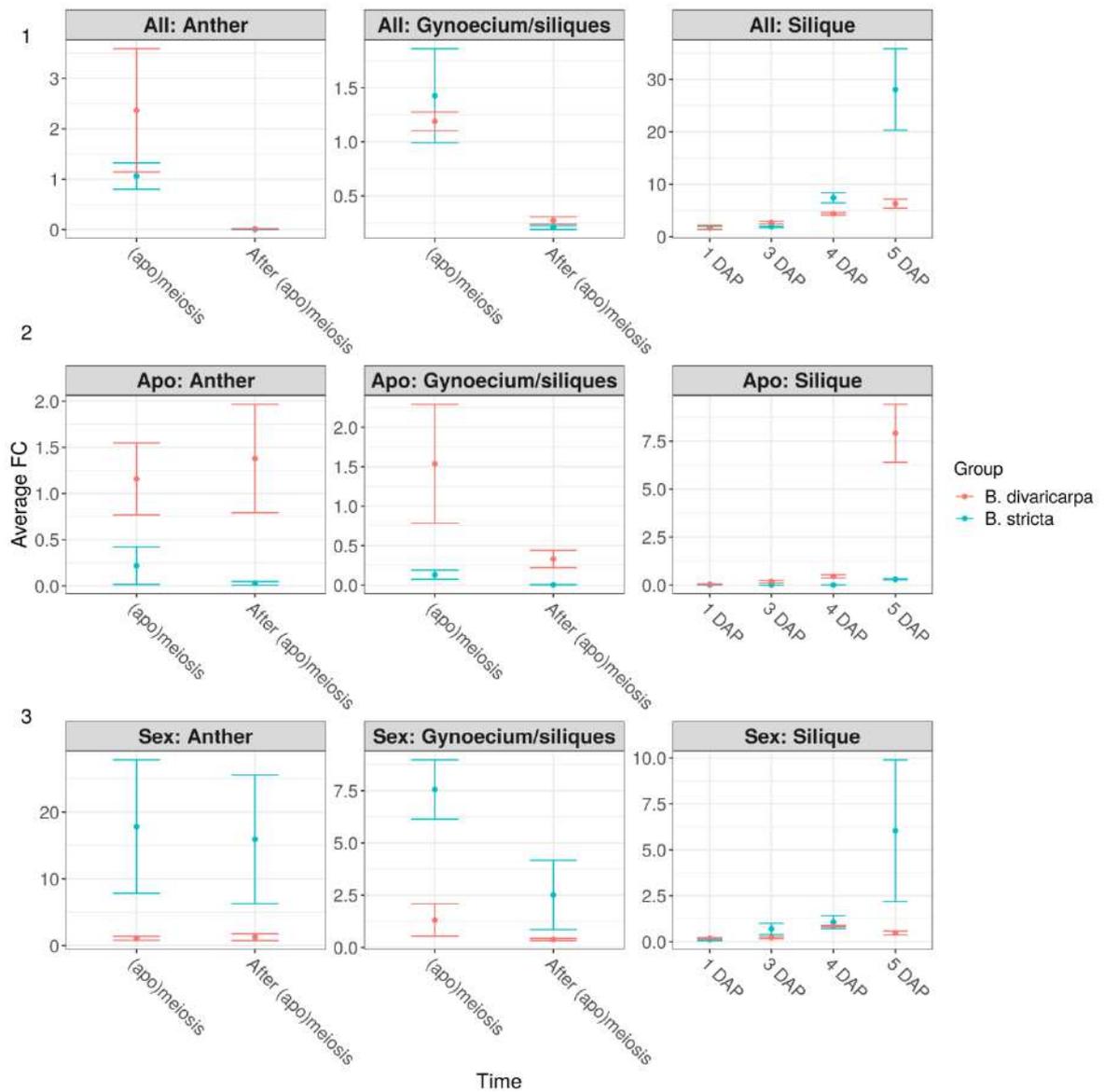


Рисунок 67 - Паттерны экспрессии гена *APOLLO*. (1) Экспрессия *APOLLO* с использованием универсальных праймеров как для половых, так и для апо-аллелей. (2) Экспрессия апо-аллелей *APOLLO* в пыльниках, гинецее и стручках апомиктических растений *B. divaricarpa* и половых растений *B. stricta*. (3) Экспрессия половых аллелей *APOLLO* в пыльниках, гинецее и стручках апомиктических растений *B. divaricarpa* и половых растений *B. stricta*. Столбцы показывают уровни изменения кратности экспрессии \pm стандартные ошибки. Дни после опыления (ДПО = DAP, день после опыления). Anther- пыльник; Gynoecium/siliques – гинецеи/стручки; Silique – стручок. (Bakin et al., 2022).

Уровни экспрессии апо-аллели *APOLLO* в (апо)мейотических пыльниках *B. divaricarpa* были слегка повышены после (апо)мейоза, тогда как в пыльниках половой *B. stricta* экспрессия отсутствовала, как это и должно быть (рис. 67). Что касается экспрессии половой аллели *APOLLO* в пыльниках, то ее уровень оставался довольно высоким во время и после мейоза у половой *B. stricta* и был очень низким во время и после (апо)мейоза у апомиктической *B. divaricarpa* (рис. 67).

Используя универсальные праймеры для выявления экспрессии как половых, так и апо-аллелей, мы обнаружили, что в пыльниках во время мейоза/апомейоза суммарная экспрессия аллелей *APOLLO* была высокой у половых и апомиктических видов, при этом в пыльниках апомиктов уровень экспрессии был почти в 2,5 раза выше. Она сильно подавлялась в пыльниках обоих видов вскоре после окончания мейоза/апомейоза (рис. 67). Что касается экспрессии аллелей *APOLLO* в гинецее и стручках обоих видов, то во время мейоза/апомейоза в гинецее обоих видов экспрессия *APOLLO* была примерно одинаковой, слегка выше у полового вида, и сильно снижалась после мейоза. После опыления уровни экспрессии оставались низкими вплоть до 4-го ДПО, затем экспрессия *APOLLO* в стручках обоих видов начала повышаться, заметные различия между половой *B. stricta* и апомиктической *B. divaricarpa* стали наблюдаться только к 5-му дню после опыления. На этой стадии экспрессия *APOLLO* у апомиктов оставалась все еще низкой, тогда как у половых растений она подскочила почти в 5 раз (рис. 75).

Таким образом, мы впервые обнаружили различия уровней экспрессии апо- и секс-аллелей *APOLLO* в генеративных органах двух видов *Boechea*, различающихся по способу репродукции. Наши исследования показали, что апо-аллель *APOLLO* активируется в гинецее и пыльниках во время мейоза/апомейоза и в стручках на 5-й ДПО у апомиктов, в то время как у половых растений эта аллель не экспрессируется. Половая аллель показала противоположную картину: у половых *B. stricta* ее экспрессия повышалась в пыльнике и тканях гинецея во время мейоза и в стручках на 5-й ДПО, в то время как экспрессия этой аллели у *B. divaricarpa* оставалась на очень низком уровне во время и после мейоза/апомейоза в пыльниках и гинецеях и в первые дни после опыления в плодах. Выявленные

паттерны экспрессии *APOLLO* представляют большой интерес и несколько отличаются от опубликованных ранее (Corral et al., 2013), разница, наблюдаемая в экспрессии *APOLLO* в нашем исследовании, также может быть как ткане-, так и видоспецифичной, кроме того, Corral et al. (2013) определяли экспрессию на микрочипах и не разделяли экспрессию *APOLLO* на апо- и секс- аллели.

6.3.5 Анализ сходства *APOLLO* у видов *Brassicaceae*

Ранее был рассмотрен проведенный нами филогенетический анализ гена *APOLLO* и его белковых ортологов (рис. 61) (Kliver et al., 2018). Тепловая карта, показанная на рис. 68, демонстрирует, что все сравниваемые белки *APOLLO* у *Boechnera* довольно схожи ($\geq 92,5\%$ сходства), несмотря на наличие пяти апо-аллелей и пяти половых аллелей этого гена (табл. 37). Филогенетическое древо *APOLLO* (рис. 61) показывает, что виды *Boechnera* сгруппированы в две отдельные субклады согласно способу размножения, т. е. ветви дерева были сгруппированы по генам, а не по видам: первая субклада включает гомозиготные по секс-аллелям виды и линии, размножающиеся половым путем, а вторая содержит образцы с апо-аллелями, размножающиеся путем апомиксиса. В то же время все виды *Boechnera*, представленные на филогенетическом древе, сгруппированы в общую кладу, отделяющую их от других родов семейства *Brassicaceae* (сходство $\geq 82,5\%$).

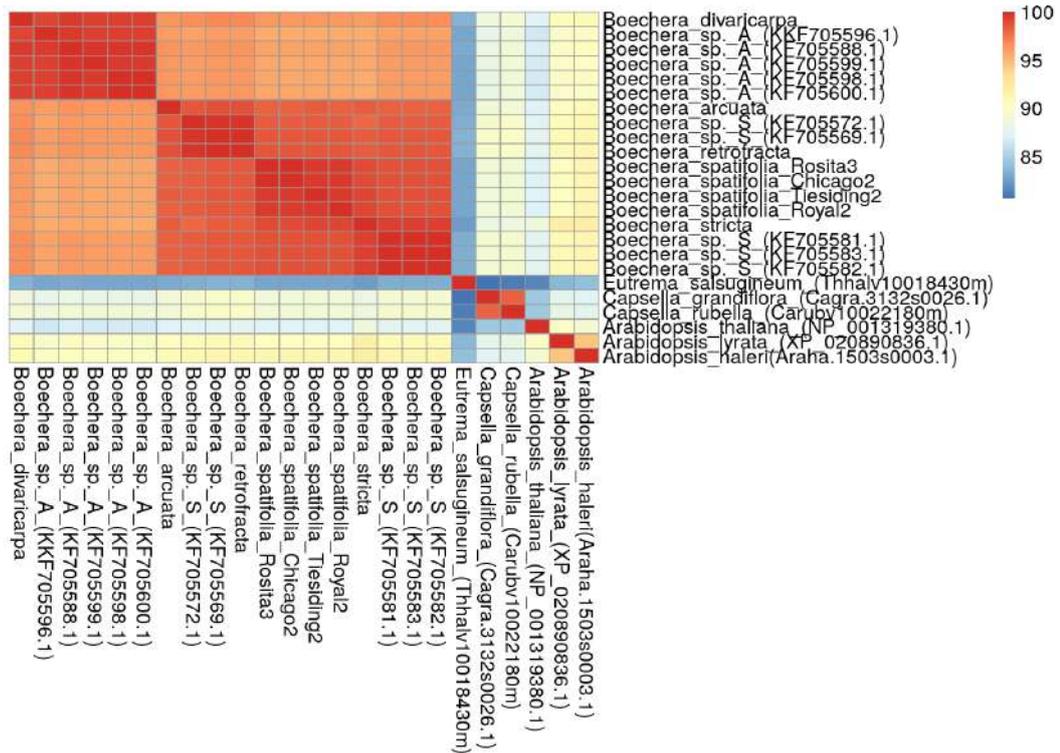


Рисунок 68 - Матрица сходства APOLLO в исследованных видах.

6.3.6 Обсуждение и выводы

Таким образом, мы изучили сходство гомологов и филогению генов *CENH3* и *APOLLO*, которые могут способствовать возникновению некоторых компонентов апомиксиса, а также сравнили паттерны экспрессии этих генов у апомиктических и половых растений *Boechera*.

Ген *CENH3* играет важную роль для клеточных делений и элиминации генома при мутациях. Мутации в *CENH3* у *Arabidopsis thaliana* вызывают нарушение расхождения хромосом при мейозе (Lermontova et al., 2011; 2015), что также использовалось для индукции элиминации генома у арабидопсиса и риса. В гибридах мутантных линий *cenh3* с диплоидными растениями дикого типа геном линии *cenh3* элиминировался (Mieulet et al., 2016). Мы показали, что ген *CENH3* является однокопийным геном и что его структура практически одинакова у семи исследованных видов *Boechera* независимо от способа их размножения (полового

или апомиктического). Полиморфные сайты были в основном обнаружены в N-концевых областях белка, хотя у *B. retrofracta* и *B. arcuata* был обнаружен один сайт в 91-й аминокислоте и два полиморфных сайта в положении аминокислот 67 и 96 соответственно, в консервативном домене гистона H3/CENP-A. Изменчивость в пределах N-конца может способствовать возникновению апомейоза, так как влияет на сегрегацию хромосом в мейозе (Lermontova et al., 2011; Ravi et al., 2011), хотя это предположение нуждается в проверке на мутантных линиях с заменой соответствующих полиморфных участков. Тем не менее, индекс сходства гена *CENH3* между всеми изученными *Boechea* составил $\geq 97\%$ (как на уровне нуклеотидов, так и на уровне белка). Кроме того, на филогенетическом дереве *CENH3*, выполненном методом максимального правдоподобия, все изученные виды *Boechea* выделялись в одну кладу, хотя и были очень близки к другим видам из семейства Brassicaceae из родов *Arabidopsis*, *Eutrema*, *Cardamine*. Анализ профиля экспрессии гена *CENH3* показал, что во время (апо)мейоза уровни экспрессии *BsCENH3* в гинецее половых *B. stricta* были более чем в два раза выше по сравнению с *BdCENH3* в гинецее апомиктических *B. divaricarpa*. После (апо)мейоза уровни экспрессии гена резко снижались в гинецеях обоих видов. А к 4-му ДПО, экспрессия *CENH3* значительно увеличилась в стручках *B. stricta*, оставаясь при этом низкой в стручках *B. divaricarpa*. Более низкие уровни экспрессии до и после опыления у *B. divaricarpa* могут указывать на возможную роль гена *CENH3* для возникновения апомейоза и инициации партеногенеза. В (апо)мейотических пыльниках *B. divaricarpa* экспрессия *CENH3* была в 1,5 раза выше, чем у *B. stricta*, что может быть связано с апомейозом при созревании пыльцы. После мейоза уровень экспрессии генов в пыльниках обоих видов падал до нуля.

Как уже было отмечено выше, у растений, размножающихся половым путем, в зародышевый мешок попадают два спермия, при этом один из них сливается с ядром центральной клетки, образуя в дальнейшем эндосперм, второй оплодотворяет яйцеклетку, в отличие от этого при псевдогамном апомиксисе зародыш развивается без оплодотворения, что является причиной «проблемы

лишнего спермия» (Spielman et al., 2003; Scott, 2007). У апомиктов оплодотворение центральной клетки гаплоидным спермием обычно приводит к соотношению геномов 4m:1p в клетках эндосперма, что вызывает абортивность семян (Grossniklaus et al., 2001). Апомиктические виды могут выдерживать такие отклонения в эндосперме за счет изменения своих систем импринтинга; однако предотвращение слияния «лишнего спермия» с ядром центральной клетки также может быть важной стратегией (Scott et al., 2008). Слияние редуцированных или нередуцированных «лишних спермиев» с центральной клеткой потенциально может повлиять на соотношение родительских геномов. Поэтому, неизвестно, каким образом центральная клетка апомиктов может избежать оплодотворения и усилить барьер против полиспермии, обусловленной «проблемой лишних спермиев» (Scott, 2007). Различия в динамике экспрессии гена *CENH3* до и после опыления в гинецее/ плодах у *B. divaricarpa* по сравнению с *B. stricta* может свидетельствовать об участии этого гена в обеспечении развития апомиктических семян благодаря элиминации хромосом мужских гамет при развитии эндосперма. Однако данное предположение требует дальнейшего доказательства.

Анализ структуры промотора гена *CENH3* выявил наличие нескольких мотивов связывания и распознавания транскрипционных факторов из семейства MYB в промоторных областях *BsCENH3* и *BdCENH3*. Наличие этих мотивов может указывать на регуляцию гена белками семейства MYB. Исследование промоторной области *CENH3* у арабидопсиса выявило два участка связывания транскрипционного фактора E2F в сайтах -163 и -115 (Grossniklaus et al., 2001). Наш анализ этой области у видов *Boechea* обнаружил данный мотив в сайте -163 в *BsCENH3* и *BdCENH3*. В положении -115 у *BdCENH3* и *BsCENH3* находится один полиморфный сайт (GCGGGAAA/GCGGGAAG). Дальнейшие функциональные исследования гена *CENH3* у *Boechea* и его эпигенетической и транскрипционной регуляции могут пролить свет на функциональные различия гена *CENH3* у апомиктических и половых растений из рода *Boechea*.

Что касается гена *APOLLO*, то пока он является единственным обнаруженным у *Boechea* геном, содержащим полиморфные аллели,

ассоциированные с апомиксисом (Corral et al., 2013). Таким образом, идентификация апо-аллелей *APOLLO* может быть использована в качестве молекулярного маркера для обнаружения апомиктических особей у видов *Boechnera*. Ранее было показано, что *APOLLO* кодирует экзонуклеазу NEN3, нами был предложен эволюционный сценарий, согласно которому после серии дупликаций одна из копий белка NEN3 у предков *Boechnera* приобрела альтернативную функцию, способствующую апомиктическому развитию (Kliver et al., 2018). Более того, было продемонстрировано, что апо-аллели подвергаются положительному отбору (Kliver et al., 2018). Используя ранее обнаруженные пять апо- и пять секс-аллелей (Corral et al., 2013), мы осуществили скрининг геномов десяти видов *Boechnera* с различными способами репродукции, а также других видов из семейства Brassicaceae, из родов *Arabidopsis*, *Eutrema*, *Cardamine* и *Capsella*, для осуществления филогенетического анализа гена *APOLLO*. Результаты этого анализа показали, что половые и апомиктические виды *Boechnera* сгруппированы в разные подклады, при этом они очень похожи друг на друга и на другие виды Brassicaceae (Bakin et al., 2022). Как и для гена *CENH3*, для аллелей *APOLLO* у видов *Boechnera* необходимы дальнейшие функциональные исследования для выяснение их предполагаемой эпигенетической и транскрипционной регуляции, а также для выяснения существуют ли функциональные различия между этими аллелями у половых и апомиктических видов. Последнее станет возможным только при наличии качественных диплоидных сборок геномов изучаемых видов. Повышение экспрессии апо-аллели *APOLLO* у апомиктов *B. divaricarpa* при (апо)мейозе в пыльниках и гинецее и снижение ее уровня с началом формирования зародышевого мешка может свидетельствовать об определенной связи между экспрессией апо-аллели *APOLLO* в апомиктах и апомейозом. Это согласуется с ранее опубликованными данными о том, что апо-аллель *APOLLO* экспрессируется исключительно в семязачатках апомиктических видов *Boechnera* на стадии (апо)мейоза (Corral et al., 2013). Активация половой аллели *APOLLO* в пыльниках и гинецее половых *B. stricta* во время и после мейоза и очень низкие уровни его экспрессии в апомиктах,

возможно, отражают связь секс-аллели *APOLLO* с мейозом и дальнейшими постмейотическими процессами. Однако увеличение экспрессии апо- и секс-аллелей в стручках на 5-й ДПО у апомиктов и половых видов соответственно требует дальнейшего объяснения. Активация суммарного гена *APOLLO*, определенного с помощью универсальных праймеров как для половых, так и для апо-аллелей, в (апо)мейотических пыльниках у апомиктической *B. divaricarpa* в два раза выше, чем у половой *B. stricta*, может свидетельствовать о роли *APOLLO* в апомейозе или мейозе при образовании пыльцы; более того, ранее сообщалось, что при развитии мужского гаметофита у апомиктической *B. divaricarpa* образуются как редуцированные, так и нередуцированные мужские гаметы (Schranz et al., 2005; 2006a). Таким образом, можно заключить, что *APOLLO* возможно выполняет видоспецифичную функцию в регуляции мейоза/апомейоза у псевдогамных апомиктов по сравнению с их половыми родственниками *Boechea*.

В заключении нужно отметить, что детальное знание структуры, филогении генов, связанных с апомиксисом, и динамики их экспрессии, вероятно, может помочь лучше понять природу регуляции апомиксиса по сравнению с половым размножением и облегчить дальнейшее изучение эволюционной, экологической и популяционной роли апомиксиса. Наличие полногеномной сборки хорошего качества позволит проводить более точные исследования структуры генома, молекулярной регуляции процессов репродукции, филогении и эволюции видов *Boechea*. Мы осуществили сборку генома двух видов *Boechea*, результаты этих исследований будут обсуждены ниже.

6.4 Молекулярные инструменты для изучения растений из рода Boechea: трансформация, микродиссекция с лазерным захватом и транскриптомика

Одним из наиболее полезных инструментов для изучения молекулярных механизмов является трансформация с целью стабильной экспрессии трансгена. Трансформация, опосредованная агробактериями, до настоящего времени является предпочтительным методом, поскольку любая последовательность ДНК,

содержащаяся между двумя индуцирующими опухоль (Ti) границами плазмиды, может быть эффективно введена в геном растения (Gelvin, 2003). Это было обсуждено нами в главе 4, где были описаны наши эксперименты по трансформации арабидопсиса. Хотя, использованный нами, метод «погружения цветков» является стандартным для стабильной трансформации *A. thaliana* (Clough, Bent, 1998), для большинства видов растений требуются более сложные процедуры трансформации. Наиболее широко используемым методом является совместное культивирование эксплантов с *Agrobacterium*, которые затем трансформируются в каллусную ткань и затем подвергаются органогенезу с дальнейшей регенерацией растения-трансформанта. С помощью этого метода можно успешно трансформировать даже сложно поддающиеся трансформации сорта различных сельскохозяйственных культур (обзор Altpeter et al., 2016). Нашими коллегами были проведены исследования нескольких половых и апомиктических видов *Boechnera* относительно их способности к трансформации с помощью *Agrobacterium*, сообщалось о возможности регенерации побегов из каллусов, полученных из гипокотилей растений полового вида *B. stricta* и апомиктических видов *B. gunnisoniana* и *B. holboellii* (Taşkin et al., 2003, 2015). Также были получены соматические зародыши, образующиеся из незрелых семядолей апомикта *B. divaricarpa* (Taşkin et al., 2009b), кроме того, были генерированы стабильные трансформанты *B. gunnisoniana* (Taşkin et al., 2003). Эти эксперименты демонстрируют, что растения *Boechnera* являются перспективным материалом для получения и изучения трансгенных линий, которые мы планируем получить в будущем.

В последнее время значительные успехи также были достигнуты в характеристике транскриптомов половых и апомиктических видов *Boechnera*. Первыми для описания транскриптомов у *Boechnera* были использованы микрочипы, позже стали применяться различные технологии, основанные на секвенировании, включая SuperSAGE с использованием секвенирования по Сэнгеру (Matsumura et al., 2006). В настоящее время наиболее распространенным методом исследования транскриптома является секвенирование РНК (RNA-seq),

основанное на технологиях секвенирования нового поколения (Wang et al., 2009). Постоянное методологическое совершенствование позволяет проводить высокоточные и высокопроизводительные исследования транскриптома одиночных клеток (Picelli et al., 2014), живых тканей и клеток (Lovatt et al., 2014), а также транскриптома с очень низким уровнем изначальной РНК (Schmidt et al., 2012; Florez-Rueda et al., 2016). Неудивительно, что большинство исследований транскриптома у *Boechea* сосредоточились на изучении различий в экспрессии между апомиктическими и половыми линиями (Sharbel et al., 2009, 2010; Amiteye et al., 2011, 2013; Aliyu et al., 2013; Schmidt et al., 2014; Shah et al., 2016), в то время как меньшее количество исследований направлены на изучение экологических взаимодействий растений с окружающей средой (Cano et al., 2013; Gill et al., 2016; Kannan et al., 2018).

Первые исследования транскриптома у *Boechea spp.* были выполнены Sharbel et al. (2009, 2010) с использованием техники SuperSAGE (Matsumura et al., 2006). Исследователи количественно оценили экспрессию генов в выделенных вручную семязачатках на стадии ММС двух половых (*B. stricta* и *B. holboelli*) и двух апомиктических линий вида *B. divaricarpa*. Кроме того, с использованием технологии Roche 454, были секвенированы две библиотеки кДНК, представляющие апомиктические и половые линии (Sharbel et al., 2009). Эти исследования произвели первые эталонные транскриптомы для рода *Boechea*, которые легли в основу дальнейших исследований. В следующих экспериментах Sharbel et al. (2010) количественно оценили экспрессию генов между одним апомиктом и одной половой особью *Boechea* в четырех временных точках развития, однако эти эксперименты были выполнены без биологических и технических повторностей. Были идентифицированы специфические для каждой стадии и гетерохронные паттерны экспрессии генов (Sharbel et al., 2010). Поскольку в первых исследованиях транскриптома (Sharbel et al., 2009, 2010) использовались единичные библиотеки, полученные из отдельных особей без биологических повторностей, они не могут объяснить вариации между особями и не имеют статистической достоверности для надежной идентификации генов, которые по-

разному экспрессируются у половых особей и у апомиктов (Lee et al., 2000; Meyers, 2004; Conesa et al., 2016).

С помощью повторного анализа данных транскриптома (Sharbel et al., 2009) и секвенирования двух библиотек была идентифицирована фракция малых РНК (Amiteye et al., 2013) транскриптома *Boechea* (Amiteye et al., 2011). Используя специфичный для *Boechea* микрочип, основанный на половых и апомиктических эталонных транскриптомах (Sharbel et al., 2009), был проведен анализ изменчивости числа копий (CNV, англ. Copy Number Variation) в транскрипционно-активных областях 10 половых и 10 апомиктических образцов *Boechea* (Aliyu et al., 2013). Классы генной онтологии, обогащенные апомиктическими CNV (например, взаимодействие пыльца-пестик), привели к гипотезе, что CNV в этих классах генов служат для буферизации эффектов вредных мутаций.

Первая попытка сравнения развития половых и апомиктических линий *Boechea* на клеточном уровне была предпринята Schmidt et al. (2014). Тогда как в предыдущих исследованиях использовались целые семязачатки (Sharbel et al., 2009, 2010), в исследовании Schmidt et al. (2014) применяли лазерную микродиссекцию (LAM, англ. Laser Assisted Microdissection) для выделения апомиктической инициальной клетки (AIC), нуцеллуса, яйцеклетки, центральной клетки и клеток синергид триплоидного апомикта *B. gunnisoniana*. После применения LAM были получены библиотеки кДНК, которые были секвенированы с использованием технологии SOLiD. Эталонный транскриптом из объединенных цветочных тканей *B. gunnisoniana* был секвенирован с помощью технологии Illumina (Schmidt et al., 2014). Анализ экспрессии генов и генное обогащение онтологии обнаружили активацию метаболизма спермидина и паттерны измененной экспрессии в AIC. Сравнение с транскриптомами, специфичными для клеток женского гаметофита *A. thaliana* (Wuest et al., 2010), выявило регуляторные пути, которые различаются у половых и апомиктических генеративных линий, включая гормональные, эпигенетические, контроля клеточного цикла и путей регуляции транскрипции (Schmidt et al., 2014). Сходным образом, сравнение специфичных для яйцеклеток

транскриптомов *B. gunnisoniana* и *A. thaliana* выявило гены, экспрессирующиеся только в апомиктических яйцеклетках (Florez-Rueda et al., 2016).

Кроме того, проводились исследования реакции апомиктических и половых проростков *Boechnera* на абиотические и биотические условия и стресс-специфические изменения окружающей среды, которые также могут лежать в основе апомиксиса (Shah et al., 2016). Связь между апомиксисом и условиями окружающей среды также подтверждается явлением, известным как «географический партеногенез» (обзор Hörandl, 2006). Эта концепция основана на наблюдении того, что апомиктические линии имеют более широкие ареалы распространения, чем их половые родственники. Было обнаружено, что у видов *Boechnera* дифференциация экологических ниш обусловлена плоидностью, а не способом репродукции (Mau et al., 2015), что указывает на слабую поддержку географического партеногенеза у этого рода. Тем не менее, большие различия в уровне плоидности и способе размножения, а также их связь с дифференциацией ниш делают род *Boechnera* хорошей моделью для изучения взаимодействия растений с окружающей средой (Rushworth et al., 2011). С этой точки зрения осуществлялось сравнение транскриптомов облигатного триплоидного апомикта и диплоидного полового, изолированных из засушливой среды обитания. Было обнаружено, что определенные мейотические гены подавляются, а связанные со стрессом факторы транскрипции и шапероны активируются в апомиктических проростках (Shah et al., 2016), но насколько это связано с репродукцией остается неизвестным.

6.5 Ресурсы для геномных исследований рода *Boechnera* и проблемы анализа генома

Появление технологий секвенирования следующего поколения наряду с прогрессом в развитии и совершенствовании биоинформатических инструментов открыли новую главу в изучении апомиксиса, что позволило производить поиск локусов, связанных с апомиксисом, а также осуществлять сравнение,

генотипирование и филогенетический анализ видов и линий *Boecheera* с использованием полногеномного секвенирования.

В настоящее время геномы только двух видов *Boecheera spp.* собраны и опубликованы, геном *B. retrofracta* был собран, проаннотирован и опубликован нашей группой (табл. 25).

Таблица 25 - Общедоступные и осуществленные нами сборки генома *Boecheera spp.*

Вид, линия, диплоид <i>Boecheera spp.</i>	Сборка, размер, Mb	N50, Мпн	Гены, аннотировано	BUSCO бенчмарк ₁	ID Ссылка/доступ URL
<i>B. stricta</i> , LTM – половая (n)	189.34	2,18	27'416	C:97.4%(S:89.2%, D:8.2%), F:1.3%, M:1.3%, n:1440	Lee et al., 2017 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid72658[orgn]
<i>B. retrofracta</i> (ранее <i>B. holboellii</i>), Panther половая (n)	222.25	2,29	27'048	C:95.2%(S:87.1%, D:8.1%), F:0.6%, M:4.2%, n:1440	Kliver et al., 2018 ; NCBI BioProject ID: PRJNA418376
<i>B. falcata</i> – половая (n)	194 ²	7,68		C: 98,7%(S:95.7%, D:3.0%), F:0.2%, M:1,1%, n:4596	
<i>B. divaricarpa</i> (ES517) – 31,62 апомикт (n)	270	0,13			NCBI BioProject ID: PRJNA765627
Гибрид <i>B. stricta</i> x <i>B. retrofracta</i> (M4B) – апомикт (2n)	424,6 ³	1,67		C:99.0%[S:3.2%,D:95.8%], F:0.1%, M:0.9%,n:4596	NCBI: BioProject ID PRJNA774175

¹Аннотированные белки использовались для сравнительного анализа BUSCO C, завершённые; S, однокопийные; D, дублированные гены; F, фрагментированные; M обнаружены отсутствующие группы BUSCO (Waterhouse et al., 2018). ²Геном не собран. ³Единственный геном с диплоидной сборкой.

Мы также осуществили гаплоидную сборку и аннотацию высоко гетерозиготного генома апомиктической линии ES517 (ID PRJNA765627; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA765627>; Smetanin et al., 2022) и диплоидная сборка генома до уровня хромосом апомиктической высоко гетерозиготной линии M4B, проект ID PRJNA774175; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/774175>. Хотя результаты этих сборок и аннотация геномов загружены нами в базу данных NCBI, публикация данных находится в процессе подготовки.

И *B. stricta*, и *B. retrofracta* являются самоопыляющимися, диплоидными половыми растениями и имеют малогетерозиготные геномы. Согласно нашим данным, повторы в геноме *B. retrofracta* занимают около 40% длины генома. Почти половина из них представляют собой длинные терминальные повторы (LTR) (18,27%) (Kliver et al., 2018). У *B. stricta* только 20% генома занято повторами (Lee et al., 2017, сборка v1.2). Разница в количестве повторов у этих видов *Boechera* коррелирует с разницей в размерах их геномов (табл. 26). У некоторых апомиктических видов локусы апомиксиса связаны с гетерохроматином и/или повторяющимися последовательностями (Hand, Koltunow, 2014). Хромосомы, несущие локус *LOSS-OF-APOMEIOSIS (LOA)* у *Hieracium praelatum* и *APOSPORY-SPECIFIC GENOMIC REGION (ASGR)* у *Pennisetum squamulatum*, характеризуются протяженными повторяющимися последовательностями и областями, богатыми транспозонами (Okada et al., 2011). У апомиктического вида *Paspalum simplex* область, содержащая локусы, связанные с апомиксисом, претерпела крупномасштабные перестройки из-за мобильных элементов (Calderini et al., 2006). Ген *PARTHENOGENESIS (PAR)* апомиктического одуванчика, запускающий развитие зародыша из неоплодотворенных яйцеклеток кодирует цинковый палец K2-2, белок EAR-домена и имеет вставку транспозона с инвертированным повтором (MITE) в промоторе (Underwood et al., 2022). Такое сходство повторяющихся гетерохроматиновых областей в геномах апомиктов привело к гипотезе, что данные области могут служить водоразделом для факторов, участвующих в половом размножении, тем самым запуская апомиксис (Grossniklaus, 2001; Koltunow, Grossniklaus, 2003). В соответствии с этой идеей, некоторые апомикты *Boechera* имеют преимущественно гетерохроматиновые хромосомы (Kantama et al., 2007; Mandáková et al., 2015), а геномы ряда апомиктических линий *Boechera* обогащены семействами транспозонов (Aliyu et al., 2013). Однако из-за обширной гибридизации внутри рода *Boechera* наличие в геноме большого количества повторов может отражать не способ воспроизводства, а скорее филогеографическую историю.

Окончательная аннотация генома *B. stricta* и *B. retrofracta* включала около 27 000 генов у обоих видов. Наличие немного большего количества предсказанных транскриптов у *B. stricta* можно объяснить отсутствием данных об экспрессии генов для *B. retrofracta*, что привело к менее полной аннотации генов в целом, что подтверждается бенчмаркингом BUSCO (таблица 26). Размер собранного нами генома природного гибрида *B. stricta* x *B. retrofracta*, линии М4В, составляет 424,6 Мб, поскольку, в отличие от остальных гаплоидных сборок *Boecheera*, сборка линии М4В была диплоидная.

Сборка геномов диплоидных апомиктических видов и линий *Boecheera* представляется довольно сложной, поскольку геномы этих линий демонстрируют высокий уровень гетерозиготности (рис. 69, 70), что является результатом комбинации разрозненных геномов вследствие их гибридогенного происхождения (Beck et al., 2012; Brukhin et al., 2019). Например, уровень гетерозиготности генома *B. divaricarpa* составляет около 2,5% по оценке GenomeScope (Vurture et al., 2017). По всем причинам, упомянутым выше, секвенирование и сборка de novo такого генома может быть сильно фрагментированной и неполной. Аннотация генов, кодирующих белок, может быть не всегда правильной, учитывая, что почти идентичные гены, как известно, трудно собрать. Таким образом, может получиться мозаичная последовательность, не представляющая ни одного члена семейства генов. Высокий уровень фрагментации и неправильная сборка генома может стать препятствием для заключения верных выводов об эволюции локусов, связанных с апомиксисом, и молекулярных механизмах, лежащих в основе этого интересного явления (Claros et al., 2012; Brukhin et al., 2019).

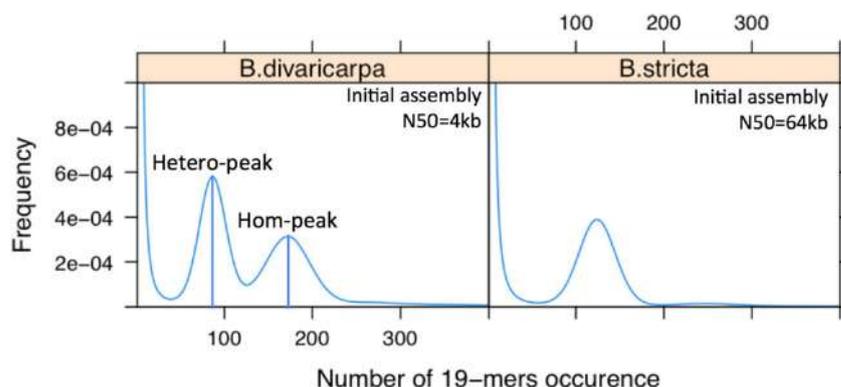


Рисунок 69 - Геном *B. divaricarpa* чрезвычайно гетерозиготен. Распределение числа встречаемости 19-меров у *B. stricta*, имеющего только один пик, указывающий на высокую гомозиготность генома, а у *B. divaricarpa*, имеющего 2 пика с выраженной разницей в высоте. Обратите внимание, что количество встречаемости различных К-меров в первом пике (около 90) вдвое меньше, чем во втором пике (около 180), что позволяет предположить, что первый и второй пики представляют собой гетерозиготную и гомозиготную части генома соответственно. Значения N50 основаны на сборке ридов с парными концами, полученных на платформе Illumina (100-кратное покрытие) с помощью алгоритма Platanus. Гетерозиготность оказывает непосредственное влияние на непрерывность сборки генома (Brukhin et al., 2019).

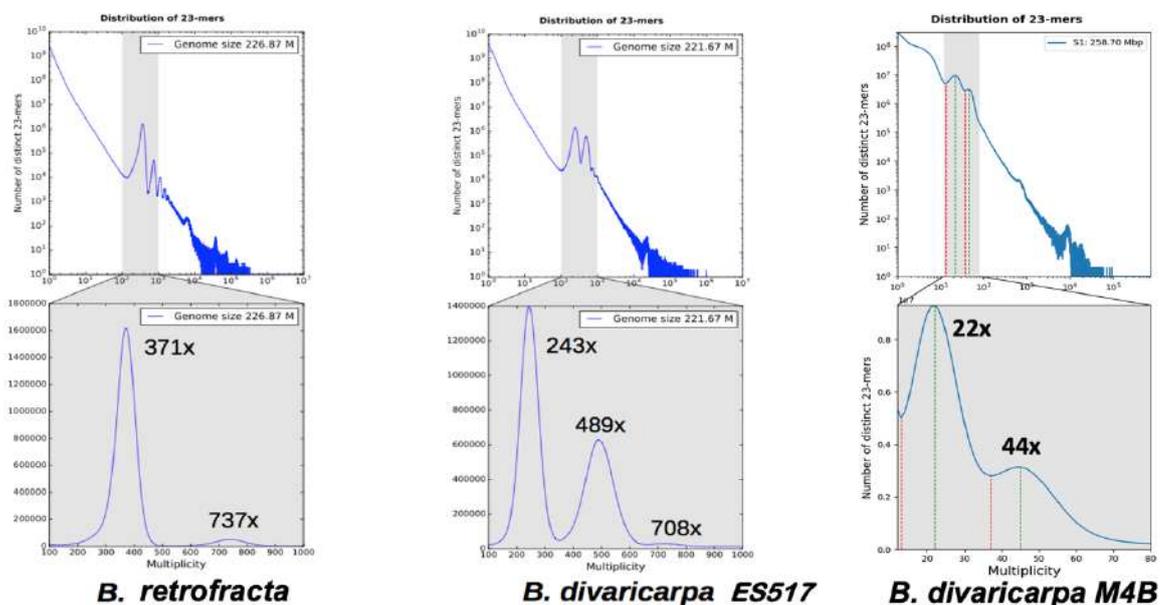


Рисунок 70 - Распределение 23-меров в библиотеках ридов с парными концами, полученных на Illumina. Один четкий основной пик в спектре *B. retrofracta* указывает на низкий уровень гетерозиготности у видов с половым размножением (левое изображение), однако при покрытии 737x и 1120x обнаруживаются дубликации и трпликации (верхний график, ось Y представлена в логарифмическом масштабе). Сопоставимые высоты первого и второго пиков у *B.*

divaricarpa ES517 и M4B указывают на высокий уровень гетерозиготности у апомиктических видов.

Ключевой проблемой является сборка коротких ридов в смежные последовательности (контиги), которые затем собираются в скаффолды представляющие собой последовательности контигов, расположенных и ориентированных в порядке их расположения на предполагаемой хромосоме. Другой сложностью является присвоение генетических вариантов правильной гомеологичной хромосоме, процесс, известный как гаплотипирование (Korbel, Lee, 2013).

Лишь недавно были разработаны методы и компьютерные программы, помогающие решить проблему сборки гетерозиготного генома. Технология секвенирования, обеспечивающая получение длинных ридов, разработанная компанией Pacific Biosciences и алгоритмы FALCON/FALCON-Unzip использовали для сборки гетерозиготных геномов, в том числе, и гибрида F1 *A. thaliana* и широко культивируемого *Vitis vinifera* cv. Каберне Совиньон (Chin et al., 2016). Дальнейшее развитие этого ассемблера (сборщика) привело к созданию нового метода FALCON-Phase, который реконструирует фазовые блоки непрерывной длины с использованием коротких ридов Hi-C, что способствует созданию настоящей диплоидной сборки (Kronenberg et al., 2018). Технология секвенирования Linked-Read (10× Genomics) недавно была успешно использована для сборки de novo гетерозиготного диплоидного гибридного генома перца F1 (*Capsicum annuum*) (Hulse-Kemp et al., 2018). Мы также применяли технологию Pacific Biosciences и Hi-C для сборки высоко гетерозиготного генома апомиктической линии M4B.

Недавно были разработаны методы поэтапной сборки полиплоидных геномов с учетом гаплотипов для случаев, когда известны родительские виды (Akama et al., 2014; Kyriakidou et al., 2018). Однако видообразование в роде *Boechea* имеет очень сложную историю, когда половые диплоиды дали начало множеству апомиктических видов посредством связанной с гибридизацией полиплоидии, аллоплоидии и анеуплоидии (Brukhin et al., 2019; Soltis et al., 2023).

Эта сложность видообразования привела к беспрецедентному разнообразию геномов апомиктических видов этого рода, которое еще более усугублялось накоплением мутаций (Lovell et al., 2017) и повышенной активностью транспозонов у апомиктов (Ferreira de Carvalho et al., 2016). Таким образом, часто неясно, какие виды и линии являются родительскими предками определенных полиплоидных видов *Boechea*. Геномный анализ на основании гаплоидного эталонного генома может не отражать реальность, особенно для апомиктов с сильно гетерозиготными диплоидными или полиплоидными геномами. В такой ситуации многие локусы могут полностью отсутствовать в эталонном геноме, поскольку даже в идеальном случае он представляет собой лишь консенсусный геном. Принимая во внимание также проблемы с получением геномных сборок для апомиктических видов, большой потенциал имеет альтернативный, безреференсный подход для сравнительного анализа геномов половых и апомиктических видов рода *Boechea*.

Безреференсный (иными словами, без выравнивания) метод для сравнения последовательностей не опирается на выравнивание и поэтому особенно ценен для анализа геномов организмов, не имеющих эталона (Zielezinski et al., 2017). K-mer или метод частот является одним из самых популярных методов сравнительного анализа генома без выравнивания, но его успешному применению может помешать недостаточная глубина секвенирования и систематическая ошибка выборки генома. Секвенирование ридов с парными концами Illumina (PE) библиотек со случайным праймированием дает наиболее подходящие данные для обработки с помощью этого подхода. В таблице 26 представлены некоторые данные с использованием секвенирования следующего поколения для ряда видов *Boechea*, которые удовлетворяют требованиям применения методов сборки без выравнивания, то есть при отсутствии референсного генома.

Для сравнения половых и апомиктических линий методом K-mer мы повторно проанализировали данные секвенирования *B. spatifolia* (Lovell et al., 2017). На рис. 71 показаны профили K-mer ($K = 27$) ридов секвенирования восьми

симпатрических пар половых и апомиктических генотипов *B. spatifolia* (Lovell et al., 2017).

Таблица 26 - Общедоступные данные геномного секвенирования¹ представителей рода *Boechera*, подходящие для анализа безреференсного генома (на основе к-меров).

Вид, Линия	Размер набора данных ²	SRA#	Ссылка
Половые диплоидные виды <i>Boechera</i>			
<i>B. stricta</i> , LTM	425x	SRR396760 SRR396762 SRR396756	Lee et al., 2017
<i>B. stricta</i> , SAD12	225x	SRR1592624	-
<i>B. retrofracta</i> (formerly <i>B. holboellii</i>), Panther	420x	SRR3929707	Kliver, S. et al. 2018.
<i>B. arcuata</i> , San Diego 0097	285x	SRR6448790	-
<i>B. spatifolia</i> , Rosita3	48x	SRR5116719	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Tiesiding2	32x	SRR5116723	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Cripple6	38x	SRR5116724	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Chiquito7	29x	SRR5116726	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Alvarado2_1	12x	SRR5116728	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Alvarado1_3	18x	SRR5116729	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Royal2	36x	SRR5116730	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Chicago2	30x	SRR5116732	Lovell et al., 2017
Апомиктические диплоидные виды <i>Boechera</i>			
<i>B. divaricarpa</i> , ES517	750x	SRR3500627 SRR3500628	-
<i>B. perennas</i> , San Diego 193153	377x	SRR6448882	-
<i>B. spatifolia</i> , Tiesiding7	31x	SRR5116718	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Rosita4	33x	SRR5116720	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Royal1	32x	SRR5116721	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Chiquito4	44x	SRR5116722	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Chicago4	37x	SRR5116725	Lovell et al., 2017

<i>B. spatifolia</i> , Cripple7	36x	SRR5116727	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Alvarado1_2	29x	SRR5116731	Lovell et al., 2017
<i>B. spatifolia</i> , Alvarado2_2	28x	SRR5116733	Lovell et al., 2017
Апомиктические полиплоидные виды <i>Boechea</i>			
<i>B. depauperata</i> ³ , Yosemite 224299	317x	SRR6448869	-

¹ Только библиотеки Illumina на основе ридов со спаренными концами (PE).

² Разы от типичного размера генома *Boechea* (220 Mb).

³ Определение способа репродукции основывалось на профиле k-mer анализа.

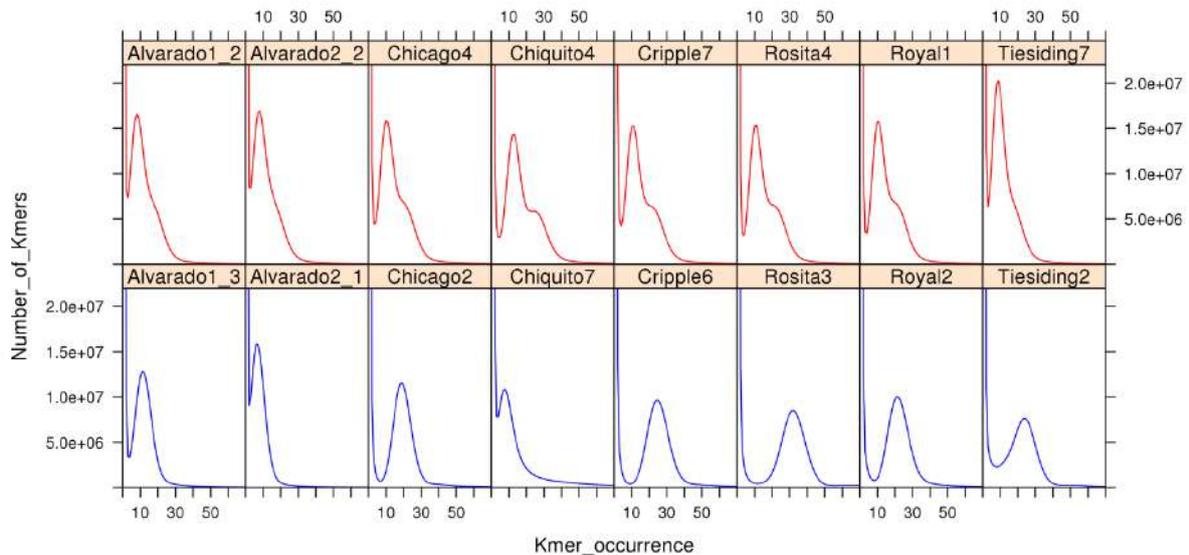


Рисунок 71 - K-mer (27) профили геномной последовательности ридов (Illumina) апомиктической (красный) и половой (синий) *B. spatifolia*. Характерная форма правого склона на графиках всех апомиктических линий. (Brukhin et al., 2019).

Профиль K-mer обеспечивает оценку эффективного покрытия последовательности и отражает уровень гетерозиготности генома, количество ошибок секвенирования, а также ошибки подготовки образцов и обработки данных секвенирования (Vurture et al., 2017). Как видно на рис. 71, профили апомиктических особей четко отличаются от профилей половых особей, даже при низком покрытии K-меров, равным 10. Профили K-меров апомиктических особей формируются за счет более высокого уровня гетерозиготности по сравнению с половыми особями (Li et al., 2017) и в случае высокого покрытия последовательностей профиль содержит два

пики, которые представляют собой гетерозиготную и гомозиготную части генома (Brukhin et al., 2019).

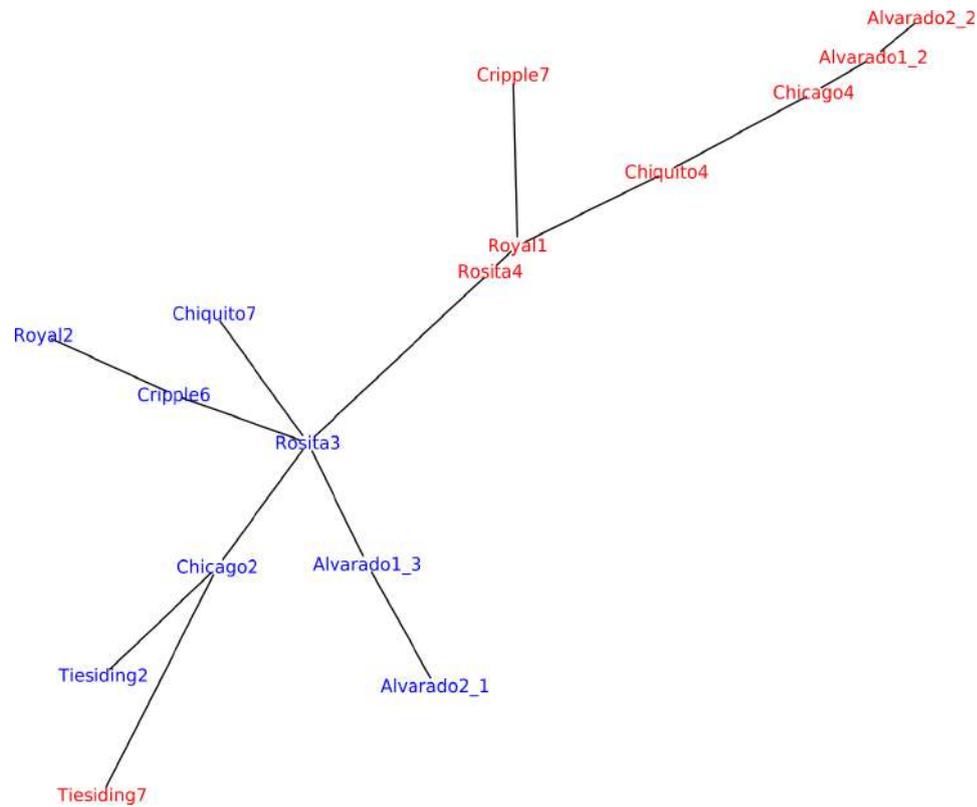


Рисунок 72 - Повторение анализа изменчивости генетической структуры *B. spatioflia* (Lovell et al., 2017). Последовательности ридов от 16 повторно секвенированных особей (8 апомиктов и половых симпатрических пар) использовали для создания минимальной связующей сети, в которой длина линии пропорциональна расстоянию Mash, которое оценивает скорость мутаций между геномными последовательностями особей *B. spatioflia* непосредственно из графиков MinHash. (Ondov et al., 2016). Узлы представляют половые (синие) и апомиктические (красные) особи. Brukhin et al., 2019.

Мы также использовали метод без выравнивания для исследования генетического родства особей *B. spatioflia*, проанализированных Lovell et al. (2017). На рис. 72 показан анализ генетической изменчивости, аналогичный

анализу, описанному Lovell et al. (2017, рис. 1B), но с использованием программного обеспечения Mash для оценки генетической дистанции (Ondov et al., 2016). В отличие от Lovell et al. (2017), где использовали *A. lyrata* в качестве эталона для выравнивания ридов секвенирования *B. spatiofolia*, этот подход основан исключительно на данных, содержащихся в ридовых данных. Тем не менее, полученное дерево оказалось довольно похожим (Brukhin et al., 2019).

Использование секвенирования следующего поколения и новых биоинформационных подходов должно помочь преодолеть проблемы высокого уровня гетерозиготности геномов *Boechea*, возникающий в результате хромосомных перестроек, сопровождающихся аллоплоидией, анеуплоидией и заменами гомеологичных хромосом, а также облегчить подробную расшифровку геномов апомиктических растений в ближайшем будущем. В настоящее время предпринимаются попытки применения безреференсных методов сборки и сравнительного анализа таких геномов. Сочетание подходов системной биологии для полнотранскриптомного анализа РНК и геномных данных половых и апомиктических видов *Boechea*, а также функциональных подходов к трансгенным растениям облегчит расшифровку генетического контроля апомиксиса на молекулярном уровне, что является необходимым условием для создания самоподдерживающихся апомиктических гибридов из половых культурных растений.

6.6 Сборка генома *Boechea retrofracta*

Как было отмечено выше, предполагается, что некоторые апомиктические виды и линии *Boechea* возникли в результате гибридизации половых видов *Boechea stricta* и *Boechea retrofracta* (рис. 73). Ранее *Boechea retrofracta* входила в состав комплекса *Boechea holboellii (sensu lato)* (Windham, Al-Shehbaz, 2006). До недавнего времени из всех видов *Boechea* был секвенирован и собран только геном *B. stricta* (Lee et al., 2017). Мы впервые собрали и опубликовали сборку и аннотацию генома *B. retrofracta* (Kliver et al., 2018), которая представлена в базе

данных NCBI, код проекта BioProjects PRJNA418376. Наличие последовательности собранного нами генома *B. retrofracta*, а также ранее собранного генома *B. stricta* значительно облегчит сборку и аннотацию геномов родственных апомиктических гибридных видов и послужит основой для изучения особенностей гибридизационных событий, хромосомной организации, стабильности апомиктических геномов и генетических факторов, лежащих в основе апомиксиса.



Рисунок 73 - Растение и соцветие *B. retrofracta*.

6.6.1 Статистика на основе *k*-мер анализа

Нами был изучен спектр *k*-меров, построенный с помощью программы KrATER (см. рис. 70, выше). Распределение 23-меров отражало пик при 1-кратном покрытии, который соответствовал ошибкам секвенирования, и один основной пик при 371-кратном покрытии, соответствующий диплоидным 23-мерам (общим для гомологичных хромосом), однако значимый пик, связанный с гетерозиготными позициями генома не обнаруживался (рис. 70). Тем не менее, мы обнаружили несколько небольших дополнительных пиков при двойной (737х) и тройной (1120х) глубине покрытия, которые, вероятно, связаны с дупликациями и трипликациями соответственно.

Размер генома *B. retrofracta* был оценен близким к 227 Мб, что соответствовало предыдущим оценкам минимального размера генома у представителей рода *Boecheera*, соответствующим 200 Мб (Anderson et al., 2011b).

6.6.2 Сборка и оценка генома

Нам удалось достигнуть N50, равного 2 297 899 п.н., L50, равного 25, и общей длины сборки 222,25 Мб для конечных скаффолдов, что очень близко к нашей оценке, основанной на 23-мерном анализе. Подробные статистические данные, включая N50 и общие значения сборки для каждого этапа сборочного конвейера, приведены в таблицах 27 и 28. Важно отметить, что окончательная сборка (табл. 27, колонка окончательные скаффолды) имеет меньший размер по сравнению с предыдущими промежуточными сборками благодаря фильтрации на последнем этапе. Все скаффолды короче 250 п.н. (длина считывания L1B400) рассматривались как артефакты сборки и удалялись. Однако размер окончательной сборки (222,25 Мб) ближе к предполагаемому размеру генома (226,87 Мб), чем размер промежуточных сборок.

Оценку полноты сборки проводили с помощью программ SEGMA и BUSCO. В собранном геноме идентифицировано 242 (97,58%) полных основных гена эукариот (англ. SEGs - core eukaryotic genes). Из 1440 генов BUSCO из всех Embryophyta только 12 (0,8%) генов не были обнаружены, 6 были фрагментированы, 36 (2,5%) продублированы и 1422 (98,8%) были полными. Высокая фракция полных генов BUSCO предполагает высокую полноту сборки и ее целостность, по крайней мере, в областях, кодирующих гены.

Таблица 27 - Общая статистика по всем стадиям сборки генома (Kliver et al., 2018)

Параметр	Контиги	Улучшенные контиги	Первичные скаффолды	Промежуточные скаффолды	Скаффолды с ликвидированными пробелами	Окончательные скаффолды
Самый длинный контиг	791 985	792 340	8 101 256	9 045 706	9 049 080	9 049 080
Ns	28 100	28 100	11 890 519	16 366 994	12 409 189	12 409 189
Общая длина	225 649 216	226 402 628	236 469 041	240 945 496	241 014 839	222 253 471

Таблица 28 - Значения N50 для всех стадий сборки и несколько различных ограничений для скаффолдов минимальной длины (Kliver et al., 2018)

Длина отсечки скаффолда	Контиги	Улучшенные контиги	Первичные скаффолды	Промежуточные скаффолды	Скаффолды с ликвидированными пробелами	Окончательные скаффолды
все	85 286	84 648	1 256 534	1 898 006	1 898 985	2 297 899
>=100	85 286	84 648	1 256 534	1 898 006	1 898 985	2 297 899
>=250	101 388	100 393	1 442 421	2 296 484	2 297 899	2 297 899
>=500	115 732	115 486	1 538 795	2 678 857	2 680 941	2 680 941
>=1000	122 300	121 678	1 704 064	2 678 857	2 680 941	2 680 941

6.6.3 Аннотация повторов, поиск вариантов и генотипирование

Всего было маскировано примерно 85 Мб (38,13 %) сборки. Подробное описание аннотированных типов повторов приведено в таблице 29. Важно отметить, что большое количество (10,96% от размера сборки) рассеянных повторов не было классифицировано. Результаты представлены в таблице 30.

Таблица 29 - Повторы, найденные с помощью RepeatMasker

Класс	Количество элементов	Общий размер п.н.	Фракция сборки, %
SINEs	577	125 298	0.06
LINEs	7 075	4 351 241	1.96
LTR элементы	51 040	40 608 195	18.27
DNA элементы	31 638	12 868 684	5.79
Неклассифицированные	82 693	24 363 135	10.96
Всего рассеянных повторов	-	82 316 553	37.04
Малые РНК	5 461	1599354	0.72
Сателлиты	1 541	573 026	0.26
Простые повторы	2044	363 642	0.16
Низкой сложности	56	7 456	0

Таблица 30 - Результаты повторного маскирования, выполненного тремя разными инструментами: RepeatMasker, TRF, Windowmasker

Инструмент	Количество повторов	Общий размер, Мbp
RepeatMasker	173 023	82.31
TRF	100 593	17.41
Windowmasker	1 104 650	64.20

Всего в геноме было обнаружено 3341 ОНП (SNP) и 1317 инделов. Среди них 103 (3,08 %) ОНП и 97 (7,37 %) инделов были гомозиготными и, следовательно, наиболее вероятными артефактами выравнивания, сборки или поиска ОНП. Средняя плотность гетерозиготных ОНП и инделов в немаскированных областях (всего 138 Мб) составляет 0,0235 ОНП и 0,0089 инделов на т.п.н., соответственно, что свидетельствует об очень низкой гетерозиготности генома *B. retrofracta*.

6.6.4 Предсказание белок кодирующих генов и нкРНК

В геноме *B. retrofracta* всего было предсказано 27 048 генов и 28 269 транскрипта. Гены, кодирующие тРНК и рРНК, предсказанные с помощью tRNAscan-SE и Barrnap, приведены в таблицах 31 и 32 соответственно.

Таблица 31 - Аннотированные тРНК

Тип тРНК	Количество
стандарт декодирования тРНК 20 АА	1126
Селеноцистеиновые тРНК (ТСА)	0
Возможные супрессорные тРНК (СТА, ТТА)	3
тРНК с неопределенными изотипами	5
Выяснение филогении Brassicaceae с использованием ядерных генов	32
Раскрывает вложенную радиацию и поддерживает конвергентную морфологическую эволюцию, предсказанных псевдогенов	
Всего тРНК	1 166

Таблица 32 - Аннотированные рРНК.

рРНК	Завершено (>= 80% ожидаемой длины)	Частично (<80% ожидаемой длины)
5.8S	178	53
5S	601	104
28S	0	1 782
18S	1	1 458
12S	0	173
16S	0	607

6.6.5 Реконструкция дерева видов

В ходе распределения белков по ортологическим группам у семи видов (*B. retrofracta*, *B. stricta*, *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. rubella*, *Cardamine hirsuta* и *E. salsugineum*) выявлено 8959 однокопийных ортологов.

На основе этих ортологов было построено филогенетическое дерево, укорененное на *E. salsugineum* в качестве внешней группы (рис. 74). Все узлы имеют высокую

поддержку, кроме того, мы не обнаружили несоответствия топологии нашего дерева с деревом, реконструированным ранее (Huang et al., 2016; Kumar et al., 2016).

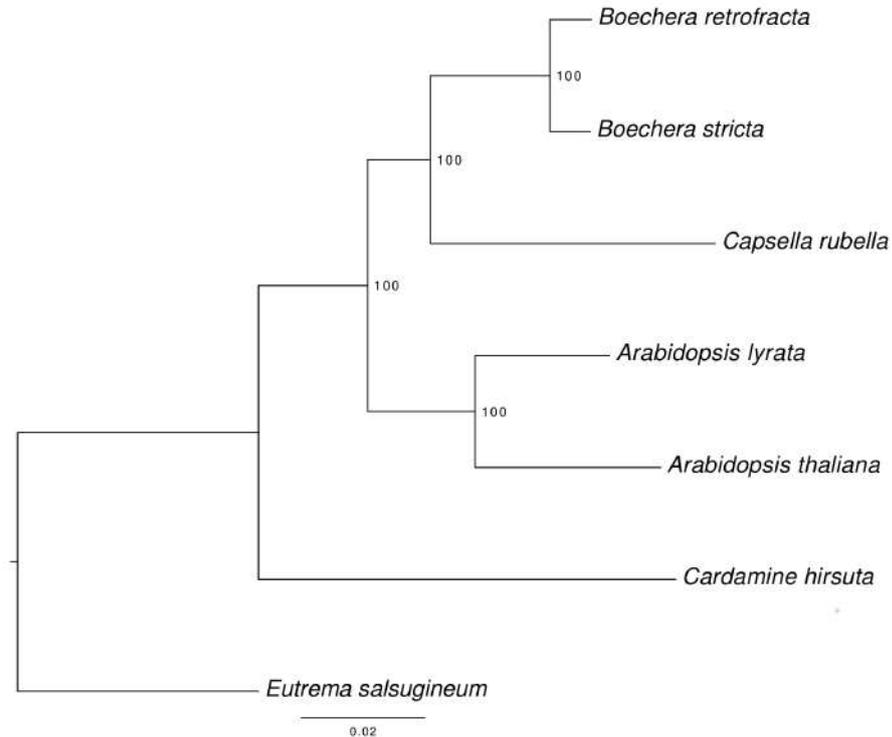


Рисунок 74 - Филогенетическое дерево для семи видов из семейства Brassicaceae, которые использовали для анализа. Дерево максимального правдоподобия было реконструировано с помощью программы RAxML с использованием 8959 обнаруженных однокопийных ортологов и протестировано в тысячекратных повторностях начальной загрузки. Числа рядом с узлами представляют соответствующую поддержку бутстрэпов.

6.6.6 Полногеномное сравнение

В качестве примера полногеномного сравнения была построена круговая диаграмма для *B. retrofracta* и *B. stricta* (рис. 75). Поскольку сборки геномов обоих видов были выполнены на уровне скаффолдов, было трудно определить какие-либо

крупные перестройки геномов. Однако этот график является визуальным способом представить разрозненность обеих сборок.

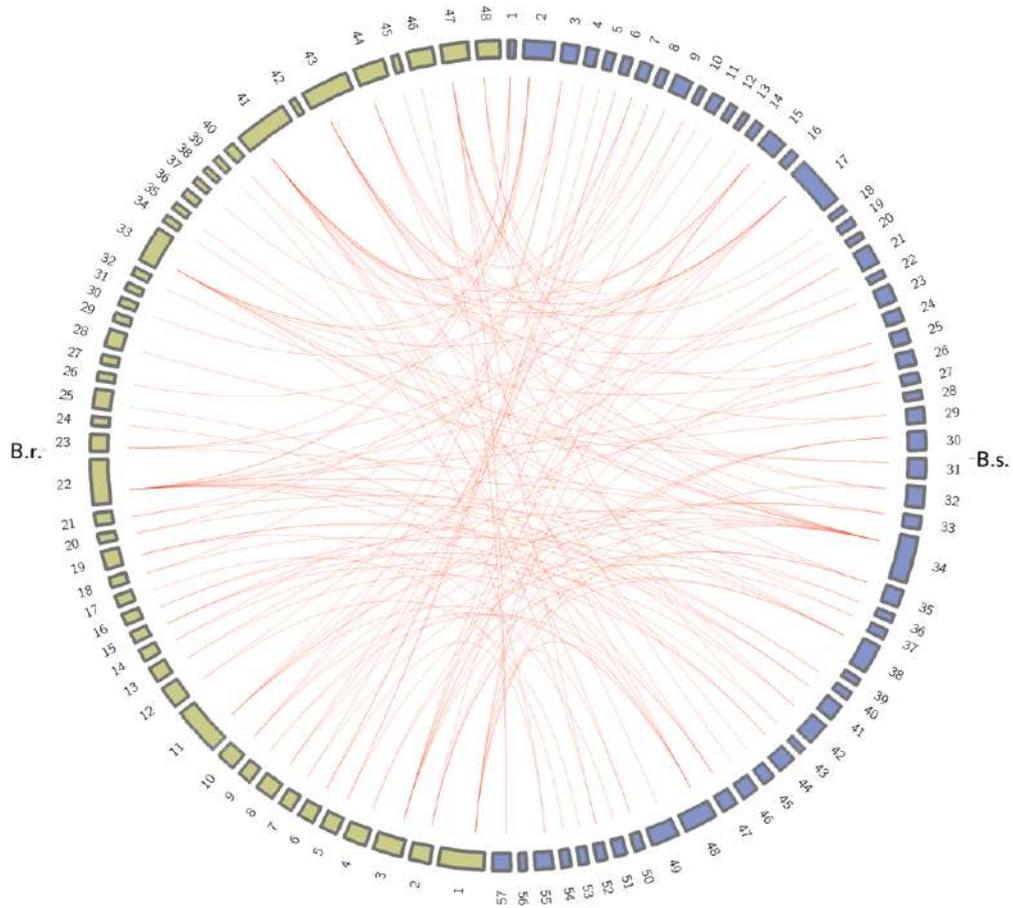


Рисунок 75 - Сравнение геномов *V. retrofracta* и *V. stricta* на уровне скаффолдов (Kliver et al., 2018)

6.6.7 Обсуждение и выводы

Таким образом, мы впервые осуществили сборку de novo и аннотацию генома *Boechea retrofracta*, многолетнего цветкового растения, принадлежащего к семейству Brassicaceae, произрастающего в Северной Америке. Геном *V. retrofracta* продемонстрировал очень низкий уровень гетерозиготности по сравнению с геномами апомиктических линий (Fisher, 1999; Johri, 1984; Asker, Jerling, 1992; Savidan, et al., 2001; Bicknell, 2004; Schön, et al., 2004; Kotani, et al., 2014; Aliyu, et

al., 2010; Hojsgaard, et al., 2014; Hojsgaard, 2018). Примечательно, что повторы в геноме *B. retrofracta* занимают почти 40% размера генома. Почти половина из них были LTR (18,27%). Было обнаружено, что общий размер генома составляет 222 Мб, что почти в два раза больше, чем геном у *Arabidopsis thaliana* (см. таблицу 33).

Таблица 33 - Сравнение характеристик генома *B. retrofracta* с ранее секвенированными геномами *B. stricta* и *A. thaliana*. Источник для *B. retrofracta* — наша сборка (Kliver et al., 2018), для *B. stricta*, *A. lyrata* и *A. thaliana* — база данных Phytozome v12.1

	<i>B. retrofracta</i>	<i>B. stricta</i> v.1.2	<i>A. lyrata</i> v2.1	<i>A. thaliana</i> TAIR10
Общий размер генома	222 Мб	184 Мб	207 Мб	135 Мб
Количество хромосом	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 5
Белок кодирующие локусы	27,048	27,416	31,073	27,416
Количество транскриптов	28,269	29,812	33,132	35,386

В то же время количество генов, кодирующих белок в геноме *B. retrofracta* несколько меньше, чем в геномах *B. stricta* и *A. thaliana*, и значительно меньше, чем в геноме *A. lyrata* (табл. 33). Несмотря на самый большой размер генома, количество предсказанных транскриптов у *B. retrofracta* является наименьшим среди четырех сравниваемых видов Brassicaceae (табл. 33). Наличие несколько большего количества генов у *B. stricta* по сравнению с *B. retrofracta*, несмотря на меньший размер генома, может быть связано с анеуплоидией хромосомных фрагментов, либо с перестройками генома, произошедшими в результате интергибридизации, что характерно для многих видов и линий *Boecheera*.

В качестве примера того, как геном половых видов *B. retrofracta* можно использовать для изучения эволюции и происхождения апомиксиса, мы провели эволюционный анализ трех аллелей гена *APOLLO* (*APOMixis-Linked Locus*) (апо- и секс- аллелей), рассмотренный в разделе 6.2.5 настоящей диссертации. Этот ген мы исследовали более подробно как в нашей сборке *B. retrofracta*, так и у других видов семейства Brassicaceae. Наряду с описанной копией *APOLLO* нами были

обнаружены еще две, более отдаленные копии, возникшие, по-видимому, в результате двух последовательных дупликаций генов (трипликации). Филогенетическое дерево *APOLLO* указывает на то, что событие трипликации вероятно произошло до разделения изучаемых видов Brassicaceae (рис. 61). Мы также проанализировали аллели *APOLLO*, описанные у *Boechea* ssp. (Corral et al., 2013). Было очевидно, что эти аллели возникли после появления рода *Boechea*. У половых *B.retrofracta* и *B.stricta* полиморфные сайты соответствовали состоянию «половой аллели» (секс-аллели) и группировались с половыми аллелями других видов.

Полученные нами результаты согласуются с эволюционным сценарием, согласно которому, после серии дупликаций одна из копий экзонуклеазного белка NEN (предка *APOLLO*) у общего предка видов *Boechea*, подвергалась ослабленному отбору, что возможно привело к нарушению регуляции этого гена и соответственно могло поспособствовать возникновению репродукции путем апомиксиса из половых предков с последующим разделением апомиктических линий. Эта модель эволюции аллелей *APOLLO* может объяснить феномен возникновения апомиксиса у некоторых видов *Boechea* в диплоидном состоянии в результате событий дупликации, а не полиплоидии.

В заключении можно отметить, что увеличение числа секвенированных геномов видов из экономически важного семейства Brassicaceae будет способствовать будущим генетическим, геномным, эволюционным исследованиям и исследованиям доместикации новых видов из этого семейства. *B. retrofracta* является предком некоторых гибридов, включая апомиктические виды, например *B. divaricarpa*. Следовательно, сборка генома, выполненная в наших исследованиях, может помочь сборке сложных высоко гетерозиготных геномов гибридных видов *Boechea*, которые являются апомиктами. Таким образом, описанный нами геном *B. retrofracta* послужит основой для расшифровки событий гибридогенеза, которые привели к образованию апомиктических линий *Boechea*. В следующем разделе будет рассмотрена сборка высоко гетерозиготного генома

природного гибрида, возникшего благодаря естественной гибридизации *B. stricta* и *B. retrofracta*.

6.7 Сборка высоко гетерозиготного генома и хромосомный анализ апомиктического растения *Boecheira*

Нами впервые была осуществлена диплоидная сборка генома апомикта до уровня хромосом, которая может быть использована для изучения происхождения, эволюции и механизмов апомиксиса у представителей рода *Boecheira*. Для полногеномного секвенирования (WGS) мы использовали природный гибрид *Boecheira* M4B (*B. stricta* x *B. retrofracta*), апомикты которого имеют анеуплоидный диплоидный цитотип, $2n = 15$ (рис. 76). Мы стремились получить сборку с полностью разрешенными гомологичными (диплоидными) хромосомами, чтобы сохранить истинную структуру апомиктического генома, что облегчает обнаружение геномных областей, связанных с апомиксисом. Для создания сборки данные секвенирования в виде длинных ридов, полученных с помощью Oxford Nanopore Technology (ONT), были собраны ассемблером Canu. Полученная сборка была скорректирована конвейером Nextpolish с использованием коротких ридов, полученных на платформе технологии Illumina. Коррекцию сборки осуществляли с помощью конвейера Bionano Genomics и данных оптического картирования. Полученные суперскаффолды располагали на хромосомах на основе проведенных экспериментов GISH (англ. Genome In Situ Hybridization) (рис. 76), выполненных согласно методике, описанной в Mandáková et al., 2015. Сборка размещена на портале NCBI: BioProject JAMKOQ000000000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/774175> Smetanin D., Grossniklaus U., Brukhin V., Mandáková T., Bakin E., Nobre S., Rueda A. Статья находится в процессе подготовки).

Как отмечалось выше, гибрид *Boecheira* M4B является апомиктическим анеуплоидом, который воспроизводится, минуя строгий мейоз и спаривание хромосом. Полный ядерный геном этого гибрида представлен 15 хромосомами и

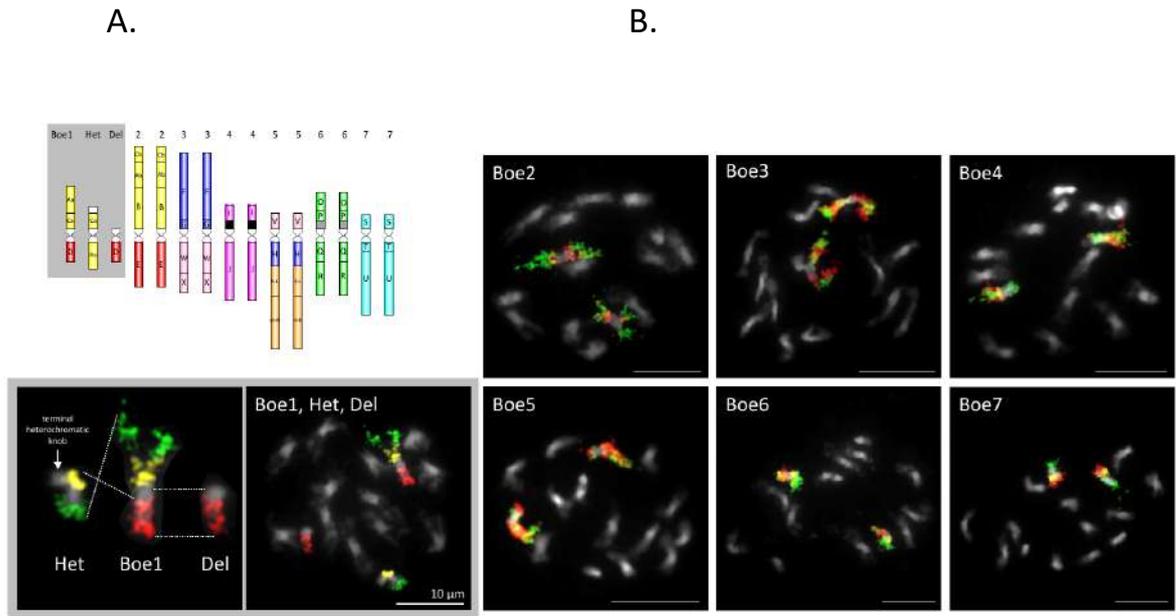


Рисунок 76 - Цитомолекулярная диаграмма структуры хромосом апомиктического гибрида *Boechea stricta* x *B. retrofracta* (M4B), построенная с помощью комбинации сравнительного окрашивания хромосом (ССР - comparative chromosome painting) и геномной гибридизации *in situ* GISH. (А) Кариотип с анеуплоидным ($2n = 15$) числом хромосом. Реконструированная структура хромосом, полученная сравнительным окрашиванием хромосом (ССР); границы ВАС-клонов *A. thaliana* определяют контиги ВАС, представляющие 24 геномных блока (АСК - Ancestral Crucifer Karyotype), составляющих кариотип предков крестоцветных (Schranz et al., 2006b) и идентифицированных на хромосомах *Boechea* (Mandáková et al., 2015). Геномные блоки обозначены заглавными буквами и раскрашены разными цветами. (В) Девять хромосом (9R), включая *Boe1*, *Het* и *Del*, происходят от генома *B. retrofracta*, остальные шесть хромосом происходят от генома *B. stricta* (6S). Выявленная гомогенизация повторяющихся последовательностей позволяет предположить, что гибрид M4B, вероятно, очень древний, а геномный состав 9R+6S предполагает, что гибрид M4B, возможно, претерпел более сложную эволюционную историю, чем простая гибридизация.

имеет размер, вдвое превышающий размер генома других половых форм *Boechea*, благодаря диплоидной сборке. Предполагаемыми предковыми видами этого гибрида были половые диплоиды *B. stricta* и *B. retrofracta*, причем нами было обнаружено, что девять хромосом происходят от генома *B. retrofracta*, а шесть от *B. stricta*. Частично общие сигналы гибридизации зондов, соответствующих геномной ДНК *B. retrofracta* и *B. stricta*, вероятно, связаны с гомогенизацией повторяющихся последовательностей и позволяют предположить, что гибрид М4В, по-видимому, довольно старый и, вероятно, имел более сложную эволюционную историю, чем простая гибридизация. Мы выяснили структуру хромосом линии М4В и расположение в них предковых геномных блоков крестоцветных – АСК (Ancestral Crucifer Karyotype) (Schranz et al., 2006b; Mandáková et al., 2015). Особый интерес представляет структура хромосом *Het* и *Del*, которые являются добавочными хромосомами, специфичными для апомиктов рода *Boechea*. Хромосомы *Het* и *Del* возникли благодаря амплификации перицентромерного хроматина в гомологичной хромосоме *Boel*, центромерному разрыву между блоками Са и D и перицентрической инверсии блока Са. В итоге сформировалась метацентрическая хромосома *Het* с центромерой между блоками Аа и Са и терминальным герохроматическим вздутием на блоке Са и телоцентрическая хромосома *Del*, состоящая из блока D (рис. 76). Общие характеристики осуществленной нами сборки генома М4В представлены в таблице 34.

Ранее сообщалось, что локусы апомиксиса обычно гемизиготны, содержат большое количество повторов, связанных с мобильными элементами, и связаны с гетерохроматическими участками (Underwood et al., 2022). Для поиска гентических различий у половых и апомиктических видов из рода *Boechea* мы выбрали гены М4В, содержащие "апомиктические" к-меры, для которых осуществлялся поиск гомологов из всех находящихся в открытом доступе видов из рода *Boechea*. Гомологи в М4В для удобства были разделены на две группы: содержащие (М4В_АРО) и не содержащие (М4В) апо-меры. Мы обнаружили, что для ряда генов, фланкирующие повторы TR147 и TR167 отличались у половых и

апомиктических видов, что позволило нам предположить, что эти гены могут быть каким-то образом связаны с наличием апомиктического способа воспроизводства. Соответственно, мы обнаружили гены, фланкированные этими повторами, у гибрида М4В, *B. retrofracta*, *B. stricta* и их гомологи у *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, функция некоторых из этих гомологов известна у арабидопсиса. Было обнаружено, что основное количество апоспецифических олигонуклеотидов гибридизировались с терминальным гетерохроматическим вздутием хромосомы *Het*.

Таблица 34 - Общая статистика параметров сборки генома апомиктической линии *Boechera* М4В (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/774175> Smetanin et al., 2022)

Общая длина последовательности	441,236,512
Общая длина без пропусков	424,633,334
Пробелы между скаффодами	0
Количество скаффолдов	701
N50 скаффолдов	27,840,202
L50 скаффолдов	8
Количество контигов	5,024
N50 контигов	1,627,141
L50 контигов	64
Общее количество хромосом и плазмид	17
Количество последовательностей компонентов (WGS или клон)	701

Подводя итоги наших геномных исследований, которые все еще продолжаются в сотрудничестве с коллегами из университета Брно в Чехии и Цюрихского университета в Швейцарии, можно заключить, что в настоящее время значительно улучшенные технологии полногеномного секвенирования, достижения генетики и биоинформатики в сочетании с успехами целенаправленного мутагенеза CRISPR-CAS оправдывают ожидание того, что

вскоре будут более точно и полно идентифицированы естественные гены и локусы, ответственные за апомейоз, партеногенез и независимое развитие эндосперма в семенах различных видов апомиктов. Их идентификация ответит на такие насущные вопросы, как апомиктический фенотип может быть наложен на половой путь и как развивались гены ответственные за апомиксис (Cornaro et al., 2023). С большой надеждой можно сказать, что эти открытия прольют новый свет на наше знание эволюции половой и бесполой репродукции, а также будут способствовать успешному применению апомиксиса в сельском хозяйстве.

Глава 7. Эпигенетические модификации при размножении и развитии растений

Процессы размножения и развитие растений во многом определяются взаимодействием с внешней средой. Успех этого взаимодействия зависит от пластичности фенотипа, которая помимо унаследованного особью генотипа во многом определяется эпигенетической регуляцией (Brukhin, Albertini, 2021). В дополнение к тому, как факторы окружающей среды могут изменять паттерны экспрессии генов, эпигенетическая регуляция определяет, как генетическая экспрессия изменяется во время дифференцировки одного типа клеток в другой и как паттерны экспрессии генов передаются от одной клетки к ее потомкам. Таким образом, один геном может генерировать множество «эпигеномов». Эпигенетические модификации приобретают особое значение при образовании гамет и репродукции растений, когда эпигенетические метки элиминируются в ходе мейоза и раннего эмбриогенеза, а затем обретаются вновь. Однако при бесполом размножении растений, когда мейоз отсутствует или приостановлен, эпигенетические модификации, возникшие в родительском спорофите, могут передаваться следующему клональному поколению практически без изменений. У растений, размножающихся половым и бесполом путем, эпигенетическая изменчивость имеет различное приспособительное значение. У бесполок особей эпигенетическая регуляция имеет особое значение для придания пластичности фенотипу, когда, за исключением мутаций, генотип остается неизменным на протяжении многих поколений особей. Особый интерес представляет вопрос о возможности передачи приобретенной эпигенетической памяти будущим поколениям и ее потенциальной роли для естественного отбора и эволюции.

7.1 Эпигенетические системы у растений

В последние два десятилетия появилось большое количество данных об эпигенетической регуляции растений (Verhoeven, Preite, 2014; Pikaard, Scheid, 2014;

Gehring, 2019; Ono, Kinoshita, 2021); тем не менее многие вопросы остаются невыясненными, а некоторые из обнаруженных результатов являются противоречивыми. Постоянно появляются новые в этой области данные (Brukhin, 2020; Brukhin, Albertini, 2021). В настоящей главе будут обсуждены основные выводы, полученные учеными по эпигенетике развития у растений.

Понятие эпигенетика, «эпи» (греч. ἐπι - над, выше, за пределами) и «генетика» (последовательность ДНК) относится к информации, которая существует за пределами того, что закодировано в последовательности ДНК. Несмотря на то, что ДНК в организме практически одинакова во всех соматических клетках, паттерны экспрессии генов могут сильно отличаться в различных типах клеток, и эти паттерны могут наследоваться клонально. Под эпигенетической регуляцией экспрессии генов понимают прежде всего метилирование ДНК, модификацию гистонов путем метилирования, ацетилирования и убиквитинирования N-концов гистонов, а также посттранскрипционный сайленсинг посредством малых некодирующих РНК. У модельного растения *Arabidopsis* известно более 130 генов, регулируемых эпигенетически (Pikaard, Scheid, 2014).

У растений основным сайтом метилирования ДНК является 5'-цитозин. Последний встречается в трех контекстах: симметричном CG, CHG и асимметричном СНН, где Н представляет собой любой нуклеотид, кроме гуанина (G). В симметричном контексте наиболее часто метилируются повторяющиеся мотивы CG или CHG, называемые островками метилирования CG (англ. CpG islands). Метилирование CG во время циклов репликации поддерживается ферментом метилтрансферазой 1 (MET1) полуконсервативным образом. Метилирование в контексте CHG поддерживается метилтрансферазой хромометилазы 3 (CMT3). Из-за своей асимметричной природы СНН должен метилироваться *de novo* после каждого раунда репликации. Сайты метилирования СНН катализируются метилтрансферазой 2 (DRM2), которая участвует в специфичном для растений РНК-направленном метилировании ДНК (RdDM). Метилирование СНН также может осуществляться хромометилазой 2 (CMT2), гомологичной CMT3, независимо от RdDM. Фермент снижения метилирования

ДНК 1 (DDM1) ремоделирует хроматин, удаляя линкер гистона H1 в компактных гетерохроматиновых областях, обеспечивая доступ метилтрансфераз к ДНК. Опосредованное DRM2 метилирование в основном вовлечено в метилирование эухроматиновых областей, включая короткие мобильные элементы (TE) и концевые фрагменты длинных TE, а также прицентромерные сайты (Law, Jacobsen, 2010).

Важную роль в биогенезе малых интерферирующих РНК играют полимеразы IV и полимеразы V, являющиеся растительными гомологами полимеразы II и специализирующиеся на продукции малых РНК, необходимых для RdDM. Полимераза IV синтезирует одноцепочечную РНК (оцРНК) на мишенях, которые нужно подавить, ретротранспозонах, вирусах, трансгенах или повторяющихся генах. РНК-зависимая РНК-полимераза 2 (RDR2) способствует образованию двухцепочечной РНК (дцРНК) из одноцепочечной РНК. Затем dicer-подобный 3 (DCL3) разрезает дцРНК на 24- и 23-нуклеотидные малые интерферирующие РНК (siRNA), одна цепь дуплекса поступает в Argonaute (AGO4). Связанные с AGO4 миРНК дополняются транскриптами полимеразы V и рекрутируют DRM2, который катализирует *de novo* метилирование гомологичных сайтов генома во всех контекстах (Matzke, Mosher, 2014; Zhou, Law, 2015).

Активное деметилирование ДНК происходит с помощью репрессора ДНК-гликозилазы сайленсинга 1 (ROS1), деметры (DME), деметроподобной 2 (DML2) и DML3. Механизм действия гликозилаз заключается в удалении метилированного цитозина с заменой его неметилированным цитозином. Во время размножения растений и дальнейшего онтогенеза различные режимы динамического метилирования и деметилирования ДНК во всех контекстах обеспечивают необходимую генетическую регуляцию развития (Li et al. 2018).

Помимо метилирования ДНК, большое значение для генетической регуляции имеет модификация гистонов, ядерных белков, участвующих в упаковке нитей ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции транскрипции и репликации. Ремоделирование хроматина (изменение его структуры) происходит в том числе за счет модификаций гистонов. Это изменяет доступность ДНК для факторов

транскрипции и полимераз, тем самым регулируя экспрессию генов и способствуя изменчивости фенотипа. Подобно метилированию ДНК, ремоделирование хроматина играет важную роль в репродукции и онтогенезе растений. В основном эпигенетическими метками являются метилирование лизинов гистона H3. Так, триметилирование лизина 3 и лизина 4 в гистоне H3 (H3K4me3 и H3K3me3 соответственно) приводит к образованию «активного» хроматина, позволяющего экспрессировать гены, тогда как диметилирование лизина 9 и триметилирование лизина 27 (H3K9me2 и H3K27me3 соответственно) продуцирует репрессивный хроматин, подавляющий транскрипционную активность генов. Формирование репрессивного хроматина, содержащего H3K27me3, регулирует эволюционно консервативный комплекс белков polycomb репрессивный комплекс 2 (PRC2), который регулирует многие онтогенетические процессы репродукции и начальные этапы образования семян у растений (см. разделы 4.5, 4.6.1, 4.7, 7.1).

Ацетилирование гистонов обычно является эпигенетической меткой, связанной с активным хроматином и транскрипционной активностью (Tekel et al.; 2017).

7.2 Метилирование при развитии меристемы

Отличительной чертой морфогенеза растений является тотипотентность некоторых клеток меристем растений, выполняющих функцию стволовых клеток. Эти клетки могут трансформироваться в любую клетку растительной ткани или органа. Так как меристемы сохраняются на протяжении всей жизни растения, новые органы и ткани могут образовываться бесконечно долго, и в этом смысле растения бессмертны (Brukhin, Morozova, 2011). Другими словами, клоны генотипов растений могут существовать неопределенное время за счет вегетативного размножения, а также за счет размножения *in vitro* в культуре тканей. У растений, кроме верхушечной меристемы побега, дающей начало листьям, стеблю и цветочным почкам, существуют также боковые, интеркалярные и краевые меристемы, клетки которых при определенных условиях способны к органогенезу

и соматическому эмбриогенезу (Brukhin, Morozova, 2011). С точки зрения Уоддингтона, меристематические тотипотентные растительные клетки поливалентны и могут следовать многим траекториям эпигенетического ландшафта (Waddington 1942; Waddington, Kacser 1957).

При переходе от вегетативной к генеративной фазе развития в апикальной меристеме побега (SAM) характер метилирования ДНК и гистонов существенно меняется (рис. 77) (Higo et al., 2020). После того, как в стволовых клетках меристем происходят эпигенетические модификации за счет градиентов фитогормонов и взаимодействия с окружающей средой, апикальная меристема побега превращается в меристему цветка, в которой происходит образование завязи, а в ней имеет место мейоз. Поскольку мужские и женские гаметофиты гаплоидны, возможные вредные мутации, возникшие в них, не компенсируются гомологичной аллелью, а гаметофиты, несущие такие мутации, abortируются (Brukhin et al., 2005a), что было рассмотрено в главе 2 настоящей диссертации. Однако зиготические эмбриолетальные и спорофитные мутации могут проходить через стадию гаметофита, поскольку их функция становится заметной только на стадиях зиготы/зародыша и спорофита (диплоидного растения) соответственно. Эти мутации могут передаваться гетерозиготно в сегрегирующихся популяциях (Brukhin et al., 2005a; 2005b; Brukhin et al., 2011). Благодаря своеобразному гаметогенезу и эмбриогенезу у растений многие эпигенетические метки, связанные с подавлением транспозонов, временно ингибируются малыми некодирующими РНК соседних тканей (Slotkin et al. 2009; Martínez, Slotkin 2012).

Возможно, первая эпиаллель в природе была обнаружена у льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris*), когда Карл Линней изучал форму ее цветка. У растений дикого типа форма цветка зигоморфная, т. е. билатерально-симметричная, тогда как у некоторых пелорических цветков развивается радиальная симметрия, т. е. они становятся актиноморфными (рис. 78). Генетический анализ показал, что радиальная симметрия возникает за счет метилирования локуса *Lcus*, а транскрипты этого гена не обнаружены в

актиноморфных цветках (Cubas et al. 1999). *Lcyc* гомологичен гену *Cycloidea*, который контролирует симметрию цветка львиного зева (Luo et al.1999).

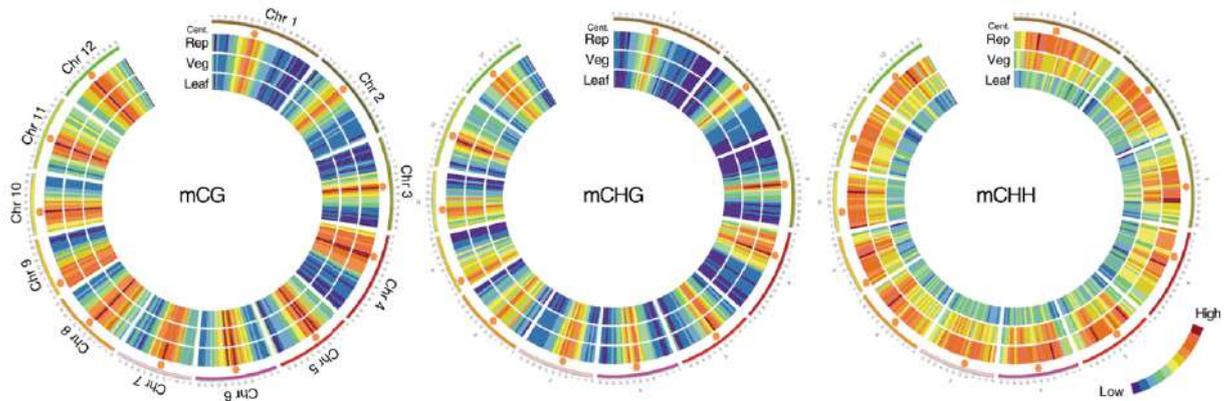


Рисунок 77 - Метилирование в вегетативных и репродуктивных меристемах. Тепловые карты, показывающие уровни метилирования цитозина в 12 растениях риса для контекстов CG (слева), CHG (в центре) и CHH (справа). (Veg) – вегетативная меристема, (Rep) – репродуктивная меристема, (Leaf) – лист. Оранжевые шестиугольники обозначают прицентромерные области (Higo et al. 2020; Brukhin, Albertini, 2021).



Рисунок 78 - Актиноморфные (пелорические) и зигоморфные (наиболее типичные) цветки льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris*). Симметрия и форма цветка определяются метилированием гена *Lcyc* (Brukhin, Albertini, 2021).

Другим хорошо известным примером эпиаллели является локус CNR (англ. *Colorless non-ripening*, рус. бесцветный незрелый) у томатов (Manning et al. 2006; Wang et al., 2020). У мутантов с этой эпиаллелью подавлено созревание семян и образуются бесцветные мучнистые плоды. Генетический анализ показал, что у растений, содержащих мутантную аллель, фактор транскрипции SBP слабо экспрессируется из-за высокой степени метилирования восходящей области гена *Le SPL-CNR*.

Эпимутации возникают гораздо чаще и быстрее, чем собственно мутации. Однако, в отличие от последних, эпимутации обратимы и поэтому имеют большое значение для быстрой регулировки и пластичности фенотипа. Эпигенетическое разнообразие может обеспечить фенотипическую изменчивость, которая способствует приспособленности популяций растений к изменяющимся условиям, а также может быть использована для селекции растений в сельском хозяйстве.

7.3 Эпигенетическая регуляция микроспорогенеза и развития мужского гаметофита

У покрытосеменных мужские и женские гаметофиты, несмотря на их небольшие размеры и малое количество клеток, являются прекрасными моделями для изучения морфогенеза и эпигенетического контроля роста и специализации клеток, клеточной полярности и сигнальных процессов.

Эпигенетические перестройки играют важную роль в регуляции развития как мужских, так и женских гаметофитов, а также оплодотворения (Slotkin et al. 2009; Walker et al. 2018; Ingouff et al., 2017; Grossniklaus et al., 1998; Ingouff et al., 2010).

У арабидопсиса было показано, что в материнских клетках пыльцы (РМС) уровень метилирования в симметричном контексте CG и CHG был выше относительно асимметричного контекста, СНН (Walker et al. 2018). Известно, что симметричное метилирование происходит в основном в мобильных элементах (TE), тогда как асимметричное гиперметилирование обычно имеет место в генах, кодирующих белок. Вероятно, повышение метилирования в симметричном

контексте способствует подавлению активности ТЕ, что обеспечивает стабильность генома до и во время мейоза. В то же время инактивация метилирования в асимметричном контексте способствует активации генов, необходимых для запуска программ формирования спермиев и дальнейшего оплодотворения. Помимо метилирования ДНК, при созревании РМС происходит резкая реорганизация хроматина, что способствует началу мейоза. Переход от митотической к мейотической фазе сопровождается увеличением пермиссивного хроматина (H3K4me3) и снижением репрессивного хроматина (H3K27me1 и H3K27me3) (Borg et al., 2020). После мейоза и асимметричного митотического деления гаплоидной микроспоры вегетативная клетка становится округлой. Она имеет повышенный уровень метилирования в участках СНН, при этом в клетке значительно теряется метилирование центромер-специфического гистона H3 (CENH3) благодаря деконденсации прицентромерного гетерохроматина, локального гипометилирования за счет активности деметилаз DME/ROS1, а также наблюдается активация мобильных элементов (Slotkin et al. 2009; Martínez Slotkin 2012; Calarco et al., 2012). Состояние центромерного гистона H3 (CENH3) играет важную роль в сборке и функционировании кинетохоров во время митотического и мейотического деления клеток. Сборка кинетохор начинается с включения CENH3 в центромерные нуклеосомы. Отложение CENH3 на центромерах зависит от стадии клеточного цикла. CENH3 также необходим для деления вегетативных клеток и дальнейшей элиминации ДНК (Lermontova et al., 2015). Гипометилирование ТЕ приводит к образованию миРНК длиной 21–22 нт, которые транспортируются в сперматозоиды для подавления их генетических мобильных элементов путем метилирования с помощью RdDM (Slotkin et al. 2009). В целом, полногеномное клеточно-специфическое профилирование метилирования выявило высокий уровень метилирования CG и CHG в ДНК микроспор, спермиев и вегетативных клеток на протяжении всего периода формирования и развития пыльцы. Тогда как большая часть метилирования СНН теряется в перицентромерной области микроспор и спермиев, оно восстанавливается в вегетативных клетках.

7.4 Эпигенетическая регуляция мегаспорогенеза и развития женского гаметофита

Мегаспорогенез и стадии развития женского гаметофита были подробно описаны в главах 1 и 2, поэтому здесь мы не будем останавливаться на описании этих процессов, а уделим внимание метилированию ДНК, сопряженному с ними.

При формировании мегаспороцитов (ММС) уровень метилирования ДНК временно снижается в контексте СНН, однако метилирование в контексте СГ остается практически неизменным (Ingouff et al., 2017). Спецификация и дифференцировка ММС, как и функциональной мегаспоры, осуществляется, в том числе, посредством межклеточных взаимодействий с помощью мобильных трансактивирующих миРНК (*tasiРНК*), продуцируемых в окружающих клетках нуцеллуса и транспортируемых в ММС, в которых реализуется сайленсинг на уровне транскрипции и трансляции (Baulcombe et al., 2014). На арабидопсисе показано, что образование таких миРНК регулируется ферментами AGO9, RDR6 и SDS3 (супрессор генетического сайленсинга 3) (Olmedo-Monfil et al., 2010). Нарушение экспрессии *AGO5* в нуцеллусе арабидопсиса приводит к нарушению инициации мегагаметогенеза.

Метилирование в контекстах СГ и СНН остается стабильным на протяжении всего мегагаметогенеза. В то же время, как было обнаружено у арабидопсиса, метилирование СГ в генах и транспозонах центральной клетки зародышевого мешка ниже, чем в спермиях (Park et al., 2016). Деметилирование ДНК в центральной клетке осуществляется благодаря активности деметра (Hsieh et al., 2009), что может свидетельствовать о подавлении потенциальной транскрипции мужских генов еще до оплодотворения. Во время гаметогенеза в зародышевом мешке эпигенетическая регуляция осуществляется мобильными некодирующими *tasiРНК*, при этом миРНК из центральной клетки проникают в яйцеклетку и подавляют активность мобильных элементов. Вышеизложенное подтверждает важность эпигенетического контроля в мегаспорогенезе и мегагаметогенезе.

7.5 Роль эпигенетических изменений при оплодотворении, эмбриогенезе и эндоспермогенезе. Импринтированные гены

Оплодотворение способствует ликвидации гипометилирования в сайтах СНН отцовского генома как в зародыше, так и в эндосперме (Ibarra et al., 2012). Вполне вероятно, что реметилирование отцовского генома происходит с помощью материнских миРНК (Lu et al., 2012). Одной из причин эпигенетической супрессии мужского генома на ранних стадиях эмбриогенеза может быть материнский контроль размеров зародыша и эндосперма (Grossniklaus et al., 1998), а также распознавание собственной пыльцы, что может иметь решающее значение при межвидовых скрещиваниях (Creasey et al., 2014).

Правильное и последовательное метилирование генома делящейся яйцеклетки является крайне важным условием нормального эмбриогенеза. Молодые зародыши и ткани эндосперма гипометилированы по сравнению со зрелыми зародышами, что свидетельствует о высокой транскрипционной активности генов в развивающемся зародыше и подготовке к покою зрелого зародыша (Bouyer et al., 2017; Kawakatsu et al., 2017). Однако при прорастании семян метаболическая и, соответственно, транскрипционно-генетическая активность зародышевых тканей вновь возрастает, что сопровождается снижением уровня метилирования в контексте СНН, связанного с активацией экспрессии белок-кодирующих генов (Papareddy et al., 2020).

Поскольку гистоны, унаследованные от яйцеклетки и спермия, не репродуцируются в клетках зародыша, а синтезируются заново, эпигенетическая «память», связанная с гистоновыми метками, элиминируется и не передается следующим поколениям клеток (Papareddy et al., 2020). Таким образом, эмбриогенез является вторым после мейоза контрольно-пропускным пунктом или клиринговым боксом (англ. clearing box), который удаляет геномные эпигенетические метки, приобретенные материнским спорофитом. По сравнению с зародышем уровень метилирования эндосперма значительно ниже, что отражает его высокую транскрипционную и метаболическую активность. В то же время

отцовские геномы (т. е. геномы, внедряемые спермиями в яйцеклетку и центральную клетку зародышевого мешка) зародыша и эндосперма более интенсивно метилированы, чем материнские геномы (Hsieh et al., 2009). По-видимому, деметилирование эндосперма также необходимо для подавления активности мобильных элементов за счет образования миРНК, которые транспортируются в клетки соседнего зародыша и посредством РНК-направленного метилирования ДНК метилируют концевые участки транспозонов, тем самым инактивируя их (Ingouff et al., 2010).

Важную роль в формировании эндосперма играют белки гистон-лизинтрансферазы, входящие в две группы поликомб (PcG) и триторакс (TrxG), которые участвуют в модификации гистонов за счет метилирования лизинов в гистоновых хвостах. Они поддерживают транскрипционно подавленное и транскрипционно активное состояние соответственно (Grossniklaus, Paro, 2014). Белки, содержащие поликомб-репрессивный комплекс 2 (PRC2), необходимы на всех стадиях развития растений и находятся под строгим генетическим контролем, главным образом посредством деметилирования ДНК. Основная функция PRC2 в центральной клетке заключается в подавлении ее пролиферации перед оплодотворением. Как отмечалось ранее, у арабидопсиса PRC2 состоит из четырех основных компонентов (субъединиц): MEA, FIS2, FIE и MSI1. Гены, кодирующие эти субъединицы, экспрессируются в центральной клетке зародышевого мешка, а мутации в любом из этих генов вызывают независимое от оплодотворения развитие эндосперма, т. е. автономное развитие (Lu et al., 2012; Ohad et al. 1999; Köhler et al., 2003; Guitton et al., 2004). Кроме того, импринтируются мутации в генах, кодирующих субъединицы PRC2. То есть они демонстрируют эффект родительского происхождения; следовательно, экспрессируются только аллели от одного родителя. Например, мутанты *mea* и *fis2* демонстрируют материнский эффект, сопровождающийся аномальным развитием семян и чрезмерным размером зародыша и эндосперма, при этом летальность зародыша не зависит от вклада отца и дозы генов (Vielle-Calzada et al., 1999, Gehring et al., 2006). При нормальном

развитии экспрессируются только материнские аллели *MEA* и *FIS2*, а их активация опосредуется деметилированием DME (Gehring, et al., 2006, Tiwari, et al., 2008).

Таким образом, в ходе полового эмбриогенеза происходит вторичное, после мейотических событий, стирание эпигенетических меток, так что метилирование ДНК и гистонов происходит почти полностью *de novo*. Уровень метилирования в зародыше выше, чем в эндосперме, и продолжает увеличиваться как в симметричном, так и в асимметричном контексте по мере созревания зародыша, что необходимо для стабилизации генома за счет нейтрализации мобильных генетических элементов, а также для постепенного снижения активности генов, кодирующих белок, для подготовки зародыша к покою семян. Поскольку эндосперм в процессе развития семени метаболически активен, и частично или полностью исчезает в зрелом семени, поглощаясь тканями зародыша, нет необходимости в повышенном метилировании его генома. Важную роль в развитии зародыша и эндосперма играют белки комплекса PRC2, которые метилируют лизин K27 хвоста гистона H3 и тем самым поддерживают подавление транскрипции генов. Кроме того, комплекс PRC2 способствует асимметричной экспрессии некоторых генов родительских аллелей (импринтингу), что необходимо для нормального развития семени. Несколько иначе происходит эпигенетическая регуляция при бесполом размножении растений.

7.6 Эпигенетическое наследование последующими поколениями. Апомиктическое и бесполое размножение

Стабильное наследование эпигенетических меток и их сохранение в будущих поколениях является важным условием приобретения популяцией растений устойчивых селективных преимуществ. Как мы обсуждали ранее, деметилирование ДНК происходит во время мейоза и раннего эмбриогенеза, тогда как метилирование *de novo* имеет место на поздних стадиях эмбриогенеза и продолжается в течение всего последующего онтогенеза нового спорофита. Что касается хроматина, то наследование его модификаций представляет собой

достаточно сложный процесс. Как известно, во время мейоза и после оплодотворения гистоны образуются заново и, таким образом, эпигенетические метки гистоновых хвостов не передаются от предыдущих поколений. Тем не менее, существует предполагаемая перекрестная связь между метилированием ДНК и ремоделированием хроматина. В связи с этим, учитывая, что цитоплазма яйцеклетки наследуется от ММС, возможна передача некоторой эпигенетической информации о модификации гистонов с помощью механизма RdDM, имея в виду, что малые некодирующие РНК переносятся из цитоплазмы ММС.

Несмотря на деметилирование, происходящее во время мейоза и эмбриогенеза, некоторые паттерны метилирования в контексте CG достаточно стабильны и могут преодолевать мейоз и наследоваться следующими поколениями (Becker et al., 2011, Schmitz et al., 2011). Однако метилирование в контекстах CHH и CHG более чувствительно к перезагрузке метилирования при мейозе (Paszkowski et al., 2011).

Как было показано на арабидопсисе, спонтанные нуклеотидные мутации встречаются крайне редко, в среднем насчитывается 20 ОНП на геном через 30 поколений произошедших от одного растения, тогда как новое метилирование обнаруживается в тысячах цитозинов (Becker et al., 2011, Schmitz et al., 2011). Однако закономерные изменения метилирования на больших участках генома в одном и том же ряду поколений также обнаруживались редко. То есть гомеостаз поддержания метилирования достаточно стабилен за счет согласованного функционирования метилаз, метилтрансфераз и деметилаз. Есть предположение, что появление новых аллелей связано с дифференциальным метилированием транспозонов, играющих основную роль в происхождении новых эпиаллелей и их наследовании (Paszkowski et al., 2011).

Одним из ярких примеров трансгенерационного наследования эпигенетических модификаций является исследование приобретения наследственного метилирования некоторых генов у арабидопсиса, вызванного водным стрессом (Tricker et al., 2013). В этом исследовании низкая относительная влажность вызывала метилирование ДНК в двух локусах, ответственных за

образование устьиц, сопровождающееся синтезом большого количества малых РНК, связанных с этим метилированием. Приобретенное метилирование появлялось в нескольких поколениях потомства, но было обратимым, если стресс, приведший к метилированию, не повторялся.

При бесполом размножении, т. е. размножении посредством вегетативных частей растения, таких как побеги, столоны, клубни, корневища и т. д., а также через соматический эмбриогенез в культуре тканей (Brukhin, Batygina, 1994; Brukhin et al., 1996; Filonova et al., 2000) мейоз отсутствует и гаметофиты не образуются; поэтому полного деметилирования и удаления гистоновых меток не происходит. Таким образом, эпигенетические закономерности могут быть частично или полностью переданы следующим поколениям спорофитов. Соответственно, эпигенетическая изменчивость у половых и бесполов растений различна. Однако не происходит и подавления активности транспозонов за счет метилирования посредством экспрессии *tasiРНК* в тканях, окружающих соматический зародыш или инициалии вегетативной почки. Это может привести к мобилизации мобильных элементов и появлению новых генотипов, называемых соматическими вариантами.

В предыдущей главе сообщалось, что большинство апомиктических растений являются полиплоидными и сильно гетерозиготными, поскольку они возникли в результате сложной гибридизации. Эпигенетические процессы, влияющие на полиплоидизацию, облегчают переход от полового к апомиктическому размножению (Брюхин, 2017). Апомиксис способствует более широкому географическому распространению вида в составе агамных комплексов и изолирует полиплоиды, помогая последним сохраняться и размножаться в этих комплексах наравне с диплоидными половыми особями. Апомиктическое размножение как правило факультативно, что обусловлено, в том числе, обратимостью многих эпигенетических процессов. Способность возврата к половому размножению позволяет апомиктам участвовать в процессах видообразования и эволюции. Поскольку при апомиксисе, как и при вегетативном размножении, мейоз, снимающий эпигенетические модификации генома,

отсутствует, эпигенетические механизмы у апомиктов действуют по-разному, и эпигенетические метки могут передаваться из поколения в поколение. Несмотря на отсутствие генетической изменчивости, апомикты прекрасно приспосабливаются к изменяющимся условиям и могут занимать огромные ареалы. Помимо клональной фиксации генома, включающей комбинации полезных признаков, успех в распространении апомиктов обеспечивается и эпигенетической регуляцией, во многом определяющей пластичность их фенотипов и высокую приспособленность к различным условиям среды. Поскольку при формировании клональных зародышей отсутствует мейоз, который в репродуктивных семязачатках выполняет функцию эпи-очистки, эпигенетически сформированные апомиктические генотипы могут обладать трансгенерационной устойчивостью. Таким образом, эпигенетические варианты апомиктов выполняют функцию генетических вариантов половых, обеспечивая приспособленность и эволюционный потенциал бесполого потомства (Verhoeven, Preite, 2014). Эпигенетические процессы, по-видимому, участвуют в ограничении формирования женского гаметофита одной клеткой у арабидопсиса и у кукурузы (Baulcombe et al., 2014, Garcia-Aguilar et al., 2010, Drews et al., 2011, Koltunow et al., 2011, Huanca-Mamani et al., 2005, Xiao et al., 2006, Varoux et al., 2007, Curtis et al., 2007). В частности, нуцеллярные клетки у мутантов *ago9* не подвергаются запрограммированной клеточной гибели, но вместо этого инициируют процессы развития, напоминающие апоспорию. Хотя напоминающие апоспоры структуры не могли развиваться дальше, упомянутое исследование предоставило доказательства того, что регуляция на уровне эпигенома важна для управления развитием женских половых клеток. У кукурузы мутант *ago104* (гомолог *AGO9*) с потерей функции производил фенотипы, похожие на апомиксис, которые давали 70% функциональных нередуцированных женских гамет (Xiao et al., 2006, Singh et al., 2011).

Другим важным механизмом, участвующим в регуляции апомиксиса и эпигенетических перестроек, является окислительный стресс. Как было предложено, он является центральным событием в переключении с полового пути на апомиксис у факультативных и циклических апомиктических эукариот (Carman

et al., 2011, Hörandl, Hadacek, 2013). Ряд исследований предполагает, что изменения во время размножения и раннего развития семян регулируются эпигенетически динамическими изменениями состояния хроматина (Baulcombe et al., 2014, Albertini et al., 2019, Huanca-Mamani et al., 2005, Xiao et al., 2006, Baroux et al., 2007, Curtis et al., 2007). Более того, существуют доказательства того, что метилирование ДНК влияет на генеративные клетки или клетки, ассоциированные с зародышевой линией. Фенотипы, подобные апомейозу, индуцировались экспериментально в репродуктивных клетках путем нарушения регуляции метилирования ДНК (García-Aguilar et al., 2010), а обработка пестиков *Boechea* веществами, влияющими на метилирование ДНК, с высокой частотой способствовала замене диплоспории *Taraxacum* типа на развитие нормальных мейотических тетрад (Gao, 2018).

В ДНК растительных клеток периодически происходят случайные (стохастические, ненаправленные) генетические модификации, такие как генетический дрейф и модификации для адаптации к меняющейся среде. Случайные эпигенетические мутации также могут участвовать в формировании адаптивных фенотипов посредством естественного отбора при условии, что они являются трансгенерационными. Направленные на среду существования эпигенетические модификации возникают целенаправленно за счет взаимодействия генотипа со средой; таким образом, они обеспечивают пластичность фенотипа (Shea et al., 2011). Поскольку генотип в бесполой популяции неизменен на протяжении длинного ряда поколений, в случае некоторых древних апомиктов, иногда на протяжении тысячелетий, их эпигенетическая регуляция может включать и выключать экспрессию отдельных генов и генных семейств в ответ на сигналы окружающей среды. Это обеспечивает пластичность фенотипов у бесполок растений. У апомиктов со стабильным генотипом последний должен быть устойчивым к широкому спектру изменений среды; следовательно, клональные генотипы имеют высокую среднюю приспособленность (Lynch, 2015). Случайное метилирование может происходить либо благодаря ошибкам ферментов метилирования, либо из-за нестандартных условий окружающей среды. В некоторых случаях стохастическое метилирование

может вызывать стойкие эпимутации, которые могут фиксироваться естественным отбором и передаваться последующим поколениям, напоминая обычные мутации в последовательностях ДНК. Однако, как правило, эпимутации обеспечивают кратковременные приспособления к изменчивым условиям среды. Как показано выше, адаптивное значение эпигенетической изменчивости у репродуктивных и апомиктических растений различно.

В течение последнего десятилетия проводились исследования с целью выявления эпигенетических изменений у апомиктических видов, связанных с судьбой репродуктивных программ (Albertini et al., 2019). Было обнаружено, что у *Paspalum simplex* и у *Pennisetum squamulatum* локус апомиксиса находится в гетерохроматиновых областях, богатых транспозонами (Calderini et al., 2006, Conner et al., 2008). Также сообщалось, что у *Eragrostis curvula* половые и апомиктические генотипы продуцировали дифференциально экспрессируемые родственные TE-последовательности (Zappacosta et al., 2014), аналогичные различия были отмечены для апомиктических растений, полученных путем удвоения хромосом (Zappacosta et al., 2014). Podio et al., (2014) обнаружили уменьшение встречаемости партеногенеза у природного апомиктического генотипа *P. simplex* после искусственного деметилирования его генома.

Выдвинута гипотеза, что у *Hieracium pilosella* (Drews et al., 2011) сигналы для образования в семязачатках мейотических тетрад из апоспорических инициальных клеток носят гормональную или эпигенетическую природу. Недавно у *Paspalum rufum* (Soliman et al., 2021) было обнаружено, что ряд генов, ассоциированных с половым развитием и апомиксисом, находятся под влиянием эпигенетических меток, специфичных для каждой стадии развития.

Карбальо с соавторами (Carballo et al., 2021) показали, что у *E. curvula* апомиктические генотипы имеют более высокие уровни метилирования ДНК по сравнению с половыми, что подтверждает гипотезу о том, что гены, контролирующие половое развитие присутствуют также и у апомиктических растений, но находятся в подавленном состоянии (рис. 79).

Благодаря достижениям современной молекулярной биологии, таким как различные виды секвенирования, в том числе секвенирование ДНК в отдельной клетке, обнаружение метилирования, методы белок-белковых взаимодействий, сортировка клеток и другие методы, стало возможным исследование многих аспектов метилирования ДНК, модификации гистонов при изменении хроматина и роли малых РНК в регуляции развития растений при взаимодействии с окружающей средой.

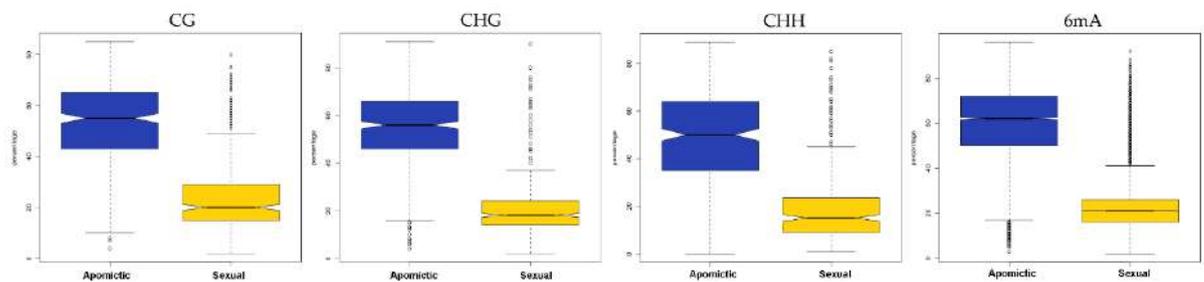


Рисунок 79 - Относительные частоты метилирования локусов, содержащихся в дифференциально метилированных областях (DMR) у *Eragrostis curvula*, идентифицированные при сравнении апомиктических и половых растений, локусы были иерархически сгруппированы. Блочные диаграммы с 3-мя образцами для каждого генотипа показывают, что общее количество DMR для всех четырех контекстов (CG, CHG, CHH и 6 мА (N⁶-метиладенина)) было выше у апомиктических (синий), чем у половых (желтый) генотипов. (Carballo et al., 2021).

Особый интерес представляет изучение этих процессов в РМС и ММС при мейозе, созревании гамет, а также при оплодотворении, эмбриогенезе и дальнейшем развитии растений. Однако ученым еще предстоит решить многие проблемы эпигенетики и ответить на важные вопросы: каков механизм «принятия решения» о метилировании ДНК и модификации гистонов в конкретной клетке многоклеточного организма, как поддерживается эпигенетический гомеостаз и почему он изменяется в ходе определенных процессов развития и что является толчком к этим изменениям? Важным вопросом является трансгенерационная

передача метилирования ДНК и гистонов и их популяционная роль. Механизм и первопричина асимметрии эпигенетических изменений в модификациях родительского происхождения, т. е. импринтинга, также во многом остаются загадкой. Наконец, изучение адаптивного значения эпигенетической изменчивости половых и апомиктических растений требует дальнейших исследований.

Экспериментальные процедуры

Растительный материал, трансгенные растения и условия выращивания

Дикий тип растений арабидопсиса был представлен видом *Arabidopsis thaliana* Heynh. var *Landsberg erecta* (прямостоячий) Ler. Линия SGT4227 была в бэкграунде *Landsberg erecta*, тогда как линии с инсерцией Т-ДНК из коллекции SALK были в бэкграунде var *Columbia*. Линии SALK были заказаны в Лаборатории геномного анализа Института Салка в Ла-Хойя, Калифорния, через Ноттингемский фондовый центр арабидопсиса NASC. Линии GT.100129, GT_5_48498, GT_5_74422, GT_5_105311, GT.100129 и SM_3.27652 были получены из Центра Джона Иннеса, Великобритания. Растения из исследуемых инсерционных линий SALK и GT, демонстрирующих снижение завязываемости семян соответствующего мутанта, генотипировали для подтверждения нарушения исследуемого гена. Мутантные аллели *cs14-1* и *cs14-2* соответствуют линиям SALK_004561 и FLAG_055B05 соответственно. Аллель *rrp4-1* представляет собой линию SALK_025995, *rrp41-2*, а *rrp41-3* линии SALK_139189 и SALK_112819 соответственно, мутант *rrp41-1* был получен из коллекции BASTA университета Висконсина.

Мутант *cul3a-1* (экотип WS) был описан ранее (Dieterle et al., 2005). Мутант *cul3b-1* (экотип Col-0, линия 003D02) был идентифицирован при поиске в базе данных тегов, фланкирующих последовательности у линий в коллекции GABI-KAT (Rosso et al., 2003). Место вставки подтверждено секвенированием фланкирующих последовательностей Т-ДНК. Репортерные линии промотор::*GUS* для *CUL3A* и *CUL3B* были описаны ранее (Dieterle et al., 2005; Weber et al., 2005). Геномный фрагмент *CUL3A* размером 4,75 т.п.н., включающий от 2,2 т.п.н. выше АТГ до 220 п.н. ниже стоп-кодона и фланкированный сайтами рестрикции *KpnI* и *XhoI*, амплифицировали из геномной ДНК с праймерами Cul3a5 (5'-GGGGTACCGAGAGACGTGACGTGT-GATTGGTA-3') и Cul3a3 (5'-ATGGGCCTTAAAAGGCCTCGAGC-3'), клонировали в модифицированный

вектор pBIN, несущий маркер гигромицина, для селекции трансформированных растений (Dieterle et al., 2005). Трансформацию мутантных растений *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* проводили методом погружения цветков (Clough, Bent, 1998). Растения T2 анализировали на комплементарность.

Растения выращивали на почве ED73 mit Bims (Universal Erde) в ростовой комнате с относительной влажностью 70% и световым циклом: 16-часовой световой день при 21°C и 8-часовой темновой при 18°C. Для скрещиваний закрытые цветочные почки кастрировали за 1 или 2 дня до опыления и затем опыляли пыльцой растений с раскрывающимися пыльниками.

Растения Boechea

Диплоидные семена полового вида *B. stricta* (ES6, ID 500206; DG; DQ013050) и апомиктической *B. divaricarpa* (ES9, 500209; BS) были любезно получены от профессора Эрика Шранца (Wageningen University & Research, Нидерланды). Растения *Boechea* выращивали согласно описанию в (Schranz et al., 2005; 2006). Семена линий ES6 и ES9 проращивали на влажной фильтровальной бумаге после обработки холодом при 4 °C в течение 3 недель в темноте для вывода семян из состояния покоя. Затем чашки Петри с семенами переносили в ростовую камеру в условиях 16 ч света: 8 ч темноты (+21 °C). Проросшие семена переносили на смесь торф: перлит (1:4) на 4 недели. Далее растения выращивали при 10°C в течение 6 недель. Цветение растений началось через 6 недель после обработки холодом.

Эмаскуляцию осуществляли на нераспустившихся цветочных бутонах, удаляя в них пыльники тонким пинцетом. Опыление производили, нанося на рыльце пыльцу того же растения. Гинецеи и стручки собирали в течение нескольких временных периодов: за сутки до опыления (во время мейоза, по которому судили по размеру бутона, см. (Taskin et al., 2009)), сразу после опыления (после мейоза), на 1-й, 3-й, 4-й и 5-й дни после опыления (ДПО). Пыльники собирали во время и после мейоза (см. рис. 80 (Taskin et al., 2009)). Собранный

материал немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С до использования.

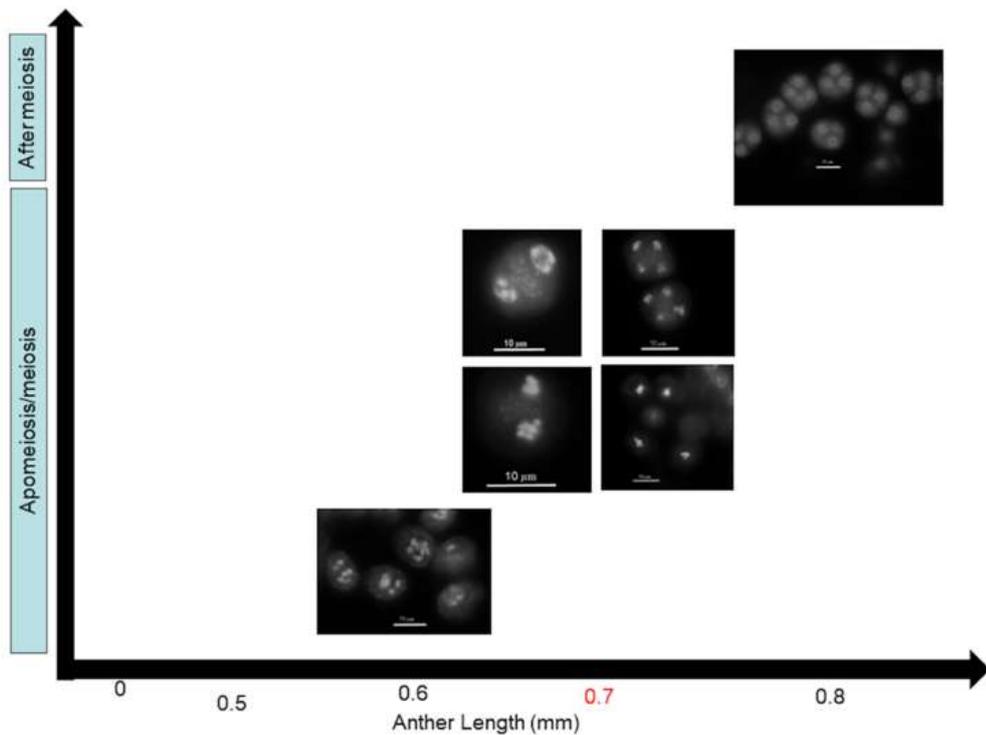


Рисунок 80 - Развитие мужского гаметофита у диплоидных *Boechera spp.* Ткани для исследования экспрессии генов собирали, как было описано ранее (Taskin et al., 2004; Taskin et al., 2009).

Для сборки и аннотации генома *B. retrofracta*, растения эталонного генотипа *B. retrofracta* были собраны в Пантер-Крик, округ Лемхи, штат Айдахо, на 45°18'11,9" северной широты, 114°22'35,9" западной долготы, на высоте 1610 м (рис. 73). Выращивание растений, экстракция ДНК и создание библиотеки производили таким же способом, как и для *B. stricta* (Lee et al., 2017). Сеянцы проращивали на асептической культуре с половинной концентрацией компонентов среды Мурасиге и Скуга. Ядра клеток использовали для выделения чистой высокомолекулярной ядерной ДНК в буфере Tris-EDTA (TE).

Получение линий с инсерцией Ds-элемента

Была использована система инсерционного мутагенеза, описанная Sundaresan et al. (1995) для арабидопсиса дикого типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. var. Ler. Мутагенез инициировали путем скрещивания растений, гомозиготных по одному *Ds* элементу, с растениями, гомозиготными по иммобилизованному *Ac* элементу. Транспозанты идентифицировали в проростках F2 на 0,7% агаризованной среде (Difco), содержащей 4,4 г/л солей Мурасиге-Скуга (Carolina Biological) и 10 г/л сахарозы (GibcoBRL), pH 5,7, 50 мкг/л канамицина А (Sigma) и 650 мкг/л альфа-нафталинацетамида (NAM) (Sigma). Т-ДНК, несущие как *Ds* элемент, так и *Ac* элемент, также содержат ген индолацетамидгидролазы (IAAH). Это позволяет осуществлять отбор против растений, содержащих ген IAAH, с использованием NAM, следовательно, отбор против растений, содержащих Т-ДНК. *Ds* элемент содержит ген устойчивости к канамицину (*nptII*), позволяющий отселектировать растения с реинсерцией *Ds* транспозона на некотором расстоянии от донорского локуса. Вставка в другую хромосому или рекомбинация позволяет *Ds* отделяться от донорского локуса, тем самым обогащая события несцепленной транспозиции. Поскольку эта процедура также отсеивает *Ac* элемент, вставка немедленно стабилизируется. *Ds*-элементы несут репортерный ген β -глюкуронидазы (*GUS*), которому предшествуют множественные акцепторные сайты сплайсинга, что позволяет *Ds*-элементу вести себя как генная ловушка (GT, genet trap) (Sundaresan et al., 1995; Springer et al., 1995). Репортерный ген (*GUS*) не имеет промотора, поэтому экспрессия гена *GUS* может происходить под промотором гена, нарушенного *Ds* элементом, только тогда, когда *GUS* встраивается в транскрибируемую хромосомную область, создавая транскрипционное слияние.

Определение полу-стерильности растений и сегрегационный анализ

Мутации, влияющие на гаметофитную фазу жизненного цикла, были идентифицированы в ходе двухэтапного скрининга по (i) снижению фертильности (абортивность семян или неразвитые семязачатки) и (ii) нарушению коэффициента сегрегации, как описано у Moore et al., 1997; Page, Grossniklaus, 2002; Brukhin et al., 2005a, Brukhin et al., 2011. Нефункциональные мегагаметофиты не могли инициировать развитие семян, что приводило к полустерильности. Эти мутации являются причиной встраивания *Ds* элемента, содержащего ген, придающий устойчивость к канамицину (Kan^r), так что Kan^r передается потомству с пониженной частотой (неменделевская сегрегация). Летали гаметофитов идентифицировали по наличию более 30% неразвитых семязачатков в зеленых стручках. Жизнеспособное потомство тестировали на искажение коэффициента сегрегации устойчивых проростков, растущей на среде, содержащей канамицин. Летальность в гаметофите или в зародыше должна приводить к уменьшению передачи Kan^r в диапазоне соотношения от 1:1 до 2:1 устойчивых к канамицину к чувствительным проросткам (Kan^r / Kan^s).

*Определение количества *Ds* в геноме каждой исследуемой линии*

Оценку количества *Ds* элементов, присутствующих в каждой линии, производили с помощью метода геномного саузерн-блоттинга. Данное исследование необходимо для гарантии того, что мутантный фенотип генерируется вставкой единственного *Ds*. Геномную ДНК экстрагировали из соцветий растений каждой отдельной линии. Для измельчения замороженной ткани в присутствии 4 стеклянных шариков диаметром 200–300 микрон (Sigma) использовали гомогенизатор (Silamat S5, Vivadent). Из полученного порошка выделяли ДНК с помощью набора Nucleon Phytopure Kit (Amersham) по стандартному протоколу. 5 мкг геномной ДНК расщепляли эндонуклеазой *EcoR1* (Boehringer Mannheim), полученные фрагменты растворяли в 0,8% агарозном геле. Затем

фракционированные фрагменты переносили на нейлоновую мембрану (Boehringer Mannheim) методом капиллярного блоттинга. Зонд *Ds-dig* был получен с помощью ПЦР-амплификации, что позволило включить дигоксигенин-11-dUTP (Boehringer Mannheim) в ДНК-зонд. Для создания зонда *Ds-dig* использовали праймеры FMI32361 (5'-ATCCCGTACCGACCGTTATCG-3') и FMI32360 (5'-CGTGTGAATGTGTGATGC-3') для реакции мечения dig (Roche Applied Science), амплифицирующей 5'-конец *Ds* из плазмиды pWS31 (Sundaresan et al., 1995). Гибридизацию с зондом *Ds-dig* проводили в течение ночи при 68°C с последующими промывками мембран с интервалами 2x5 мин при 68°C в буфере W1 (2x SSC, 0,1% SDS); 1x15 мин в H2 (0,2x SSC, 0,1% SDS) и W3 (0,1x SSC, 0,1% SDS). Детекция зонда осуществлялась по стандартному протоколу хемилюминесценции с подложкой CPD-star (Boehringer Mannheim). Бэнды, соответствующие количеству *Ds* элементов, визуализировали путем экспозиции исследуемой нейлоновой мембраны с лабораторной рентгеновской пленкой (Kodak).

Генетический анализ передачи признака по женской и мужской линии

Эффективность передачи (трансмиссии) через мужской (TEM) и женский (TEF) гаметофиты определяли реципрокными скрещиваниями с диким типом (Howden et al., 1998; Brukhin et al., 2005b). Эффективность передачи рассчитывали, как $Kan^r/Kan^s \times 100\%$; где Kan^r , – устойчивые к канамицину, Kan^s - и чувствительные к канамицину проростки.

Цитологический и гистологический анализ

Для фенотипической характеристики семязачатки и семена просветляли хлоралгидратом в соответствии с протоколом Yadegari et al. (1994). Просветленные образцы наблюдали с помощью микроскопа Leica DMR (Leica Microsystems) под оптикой дифференциального интерференционного контраста (DIC). Для

приготовления полутонких срезов стручки растений фиксировали в течение нескольких часов в 3,7% параформальдегиде в буфере PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA и 2 mM MgCl₂, pH 6,9) на льду. Зафиксированный материал далее обезвоживали в серии этанолов (30, 50, 70, 80, 90, 95 и 33 100%) и переносили в Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) в соответствии с инструкциями производителя. Из ткани, заключенной в Technovit 7100 готовили срезы на микротоме Leica RM 2145, толщина срезов была 8 мкм. После окрашивания 0,05% толуидиновым синим срезы наблюдали под оптикой со светлым полем с использованием микроскопа Leica DMR. Для количественного фенотипического анализа развития зародышевого мешка под оптикой DIC для каждого мутанта подсчитывали от 80 до 140 семязачатков, чтобы получить репрезентативный средний терминальный фенотип. Для окрашивания DAPI цветки выдерживали в 70% этаноле с последующей заменой буфером для окрашивания: CyStain UV Precise P (Partec GmbH). Флуоресценцию DAPI в пыльцевых зернах визуализировали под микроскопом Leica DM 6000. Структуру семязачатков и созревающей пыльцы также изучали на гистологических парафиновых срезах с окраской раствором гемтоксилина по Эрлиху и алциановым синим (1 % раствор в 3 % уксусной кислоте) и по Фельгену. Окрашенные срезы исследовали под микроскопом AxioPlan 2ie (Carl Zeiss, Германия). Все изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Анализ мутантов методом ПЦР

ДНК линии SGT4227 или потомства от скрещиваний (в зависимости от эксперимента) экстрагировали и подвергали скринингу на наличие вставок Т-ДНК или *Ds* транспозона в локусе *RPN1a* или *RPN1b*. Для ПЦР-скрининга были сконструированы прямые и обратные праймеры в последовательностях гена *RPN1a* или *RPN1b* с комбинацией Т-ДНК, специфичных для левой и правой границы (Alonso et al., 2004), или праймеров *Ds*-3' и *Ds*-5' (Grossniklaus et al., 1998). ПЦР-фрагменты подтверждали секвенированием. Последовательности используемых

праймеров следующие: для *RPN1a-5'*, 5'-GTCTTGCAGTTTTGTCTGGCGACC-3', 5'-GAGTTTTTTCGA-TAGCACAAGC-3' и 5'-GATGGCTCCAACTCAGGATCCCAACAGT-3'; для *RPN1a-3'*, 5'-CTTCAACTCGATCGAGACTCC-3' и 5'-GGGAACTGAAGTCATGGAACCTTGTTGAA-3'; для *RPN1b-5'*, 5'-CGATCGAATTAGTTGCTTCG-3' и 5'-GAAGCTACGACGAAGATTCC-3'; для *RPN1b-3'*, 5'-CAGCTGCCAATCAAACCAGC-3', 5'-TCAATAGAGGACTCTTCACC-3' и 5'-GCAGATAGATTTTGCCTAGC-3'. Прямой праймер MD35, 5'-AGACTTCAGAGGAGACAATGCGT-3' и обратный праймер MD139, 5'-GTTTCCTCCATATGTTCGGAGATATCCAT-3' использовали для амплификации фрагмента длиной 1280 п.н., содержащего аллель *CUL3A* дикого типа. Мутантный аллель *cul3a-1* выявляли с использованием специфичного для Т-ДНК праймера Tag5, 5'-CTACAAATTGCSTTTTCTTATTCGA-3' и праймера MD139. Праймер MD139 расположен ниже геномного фрагмента, используемого для комплементации, и, таким образом, позволяет нам различать внутреннюю часть гена *CUL3A* и геномный фрагмент, используемый для комплементации. Праймеры MD105, 5'-TTCTGATTCTACGATTGATСТАAGG-3' и MD21, 5'-GCCTAGTCTGAATCTTACTCGAАТАС-3' амплифицируют фрагмент *CUL3B* дикого типа длиной 672 п.н. Мутантный аллель *cul3b-1* выявляли с помощью праймера MD105 и праймера GABI 8760, 5'-GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC-3'.

Условия ПЦР были следующими: денатурация при 94°C в течение 4 мин, затем 34 цикла по 15 с при 94°C, 15 с при 53°C и 1 мин при 72°C, затем 5 мин при 72°C.

ОТ-ПЦР-анализ одиночных и двойных мутантов

РНК из линий, гетерозиготных по *rpn1a-1* и гомозиготных по *rpn1b-2* или *rpn1b-3*, выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen). кДНК синтезировали с использованием свободной обратной транскриптазы SuperScript II RNase H (Invitrogen). кДНК из каждой линии подвергали ПЦР с применением

прямых и обратных праймеров, сконструированных так, чтобы охватывать интрон *RPNIa* или *RPNIb* для возможности отличить кДНК от загрязняющей геномной ДНК. Для *RPNIa* использовали праймеры 5'-GATGGCTCCAACCTCAGGATCCCAACAGT-3' и 5'-GGGAACTGAAGTCATGGAACCTTGTTGAA-3'. Для *RPNIb* применялись праймеры 5'-GAAGCTACGACGAAGATTCC-3' и 5'-TCAATAGAGGACTCTTC-ACC-3'. Для обнаружения мРНК *MEA* была проведена аллель-специфическая ОТ-ПЦР, как описано ранее у Kinoshita et al (1999) и Köhler et al (2005). Для амплификации контрольной РНК GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), использовали праймеры GAPDH30 5'-GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA-3' и GAPDH5' 5'-AGGGTGGT GCCAAGAAGGTTG-3'. Для обнаружения DDB1B использовали специфические праймеры DDB1FWD 5'GGAAAATGAACCAACTAAGGAAGG-3' и DDB1bREV 5'AGAGCTTGGATTTGCTTCAGTG-3'. Для выявления EF1 α использовали праймеры EF1Fwd 5'-TTGCTCCACAGGATTGACCACTG-3' и EF1Rev 5'-TCACTTCGCACCSTTCTTGACG-3'.

Идентификация последовательностей, фланкирующих вставки Ds-элементов

Хромосомные последовательности, фланкирующие встроенный *Ds* элемент, амплифицировали с помощью термической асимметричной перемежающейся ПЦР (англ. TAIL-PCR, thermal asymmetric interlaced), согласно методике Liu et al. (1995) с модификациями, описанными Grossniklaus с коллегами (1998), с использованием вложенных праймеров на концах *Ds* (*Ds*3'-1: 5'-ACC CGA CCG GAT CGT ATC GGT-3', *Ds*3'-2: 5'- CCG GTA TAT CCC GTT TTC G-3', *Ds*3'-3: 5'-GTT ACC GAC CGT TTT CAT CC-3, *Ds*5'-1: 5'- CCG TTT ACC GTT TTG TAT ATC CCG-3', *Ds*5'-2: 5'-CGT TCC GTT TTC GTT TTT T AC C-3', *Ds*5'-3: 5'-GGT CGG T AC GGA A TT CTC CC- 3') и случайного праймера (AD2: 5'- NGT CGA (G/C)(A/T)G ANA (A/T)GA A-3'). Продукты TAIL-PCR очищали с использованием набора QiaQuick (Qiagen) и затем секвенировали. Для обратной ПЦР (оПЦР) ДНК расщепляли *Bst*VI для

идентификации 5'-конца и *NcoI* для 3'-конца. Праймеры для обнаружения 5'-конца были следующими: B34: 5'-ACG GTC GGT ACG GGA TTT TCC CAT-3' (первичная оПЦР), 4447: 5'-CCG TTT CCG TTC CGT TTT C-3' (вложенный iPCR), B35: 5'-TAT CGT ATA ACC GAT TTT GTT AGT TTT ATC-3' (первичный и вложенный), а для 3'-конца: pr3'end A1: 5'-CGA TTT CGA CTT TAA CCC GAC CGG AT-3' (основной), pr3'end A2: 5'-TCG TTT TCG TTA CCG GTA TAT CCC GT-3' (вложенный), pr3'B: 5'- GAC GGG AAC CGG TAT TTT TGT TCG GT-3 ' (первичный и вложенный). Нарушенные гены были физически картированы и сопоставлены с геномной последовательностью арабидопсиса с использованием алгоритма поиска BLAST (www.Arabidopsis.org). Также изучалась экспрессия нарушенных генов с помощью анализа мета-профиля программного обеспечения Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp>), которое обобщает информацию, накопленную в результате множества экспериментов на микрочипах (Hurz et al. др., 2008).

Реверсия мутации rpn1

Мутантную линию SGT4227 скрещивали с гомозиготными линиями *Ac/Ac* для ремобилизации *Ds* элемента. Геномную ДНК экстрагировали как из сектора, демонстрирующего фенотип, так и из секторов дикого типа гибридного растения. Для анализа ревертантных последовательностей мы использовали следующие праймеры: последовательность *PRN1a*, фланкирующая *Ds*-элемент *rpn1a-1*, и 3'-концевая последовательность *Ds*-элемента (Grossniklaus et al., 1998) и два праймера внутри элемента *Ds* 5'-CTGTTGTGTCATTTGTGTGC-3' и 5'-CAGCAAGAACGGAATGCGCG-3'. Геномную ДНК, выделенную из сектора дикого типа, амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами RPN1-3', 5'-GAGTTTTTCGATAGCACAAGC-3' и RPN1-5', 5'-СТТСААСТCGАТСГАСТАСС-3', сконструированными в генах *RPN1a* 5' и 3' *Ds* инсерции. Для секвенирования ПЦР-фрагмент длиной 720 п.н. лигировали в плазмиду pDrive и субклонировали в *Escherichia coli* (штамм DH5α), затем

выделяли, очищали и секвенировали на ДНК-секвенаторе ABI Prism 377 (Applied Biosystems) с праймерами m13-20 и m13-reverse согласно руководству Qiagen по ПЦР-клонированию.

Комплементация мутации *rpn1a*

Для комплементации использовали технологию клонирования Gateway, как описано в Curtis и Grossniklaus (2003). Мы разработали три конструкции на основе плазмиды pMDC32 (Curtis, Grossniklaus, 2003), в которых две копии промотора 35S были либо сохранены, либо заменены промотором *RPN1a*, охватывающим область с 56072 по 57803 ВАС F23N11 (1731 п.н.), с использованием сайтов рестрикции *PmeI* и *AscI*. кДНК *RPN1a* или *RPN1b* встраивали ниже выбранного промотора путем рекомбинационного клонирования (рис. 81). Гетерозиготные растения *rpn1a/RPN1a* трансформировали методом погружения цветков (Clough, Bent, 1998) в раствор, содержащий *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101. Трансформированные растения оценивали по фенотипу абортивности семян и количеству вставок Т-ДНК.

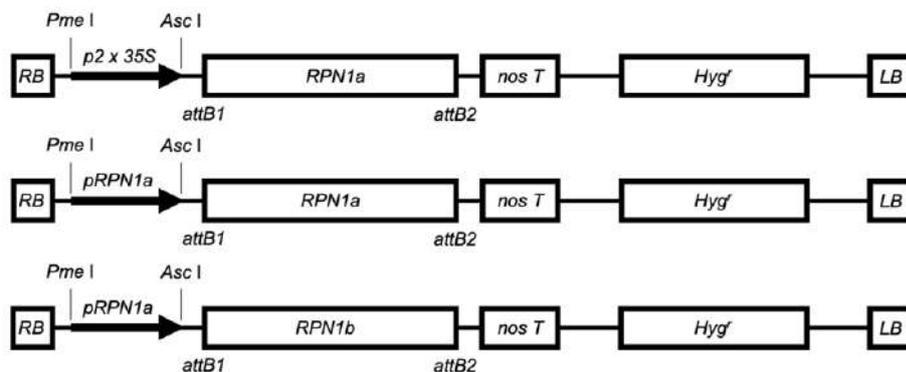


Рисунок 81 - Эксперименты по обмену промотора: конструкции для комплементации. Технология клонирования Gateway™.

Экстракция РНК и подготовка кДНК

Для экспериментов по количественной ОТ-ПЦР использовали ткани листьев, стеблей, цветочных бутонов, распустившихся цветков и стручков (от 2 до 3 мм = стручок 1; от 4 до 7 мм = стручок 2 и зрелые стручки = стручок 3), которые замораживали в жидком азоте и дважды перемалывали в течение 7 секунд со стерильными стеклянными шариками в миксере Silamat S5 (Ivoclar Vivadent). Суммарную РНК экстрагировали с использованием TRIzol (Invitrogen) в соответствии с рекомендацией поставщика. Пять микрограмм общей РНК обрабатывали 2 единицами ДНКазы I, не содержащей РНКазы (Amersham Pharmacia Life Sciences), и очищали смесью фенол:хлороформ (1:1) перед осаждением этанолом. Один микрограмм суммарной РНК подвергали обратной транскрипции в течение 1 ч при 42°C с использованием 0,5 мг случайных праймеров, 0,25 мМ дезоксинуклеотидтрифосфата, 5 мМ ДТТ и 200 единиц обратной транскриптазы Superscript II (Invitrogen) с последующей тепловой инактивацией при 72°C в течение 15 мин.

Суммарные РНК *Voechera* выделяли из гинецея и пыльников в процессе мейоза и из стручков в течение 1–5 дней после опыления (ДПО) согласно (Taskin et al., 2009) с помощью мини-кита Purelink RNA (Invitrogen-12183018A) и реагента TRIzol (Invitrogen, 15596018). Качество РНК проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле, концентрацию РНК измеряли с помощью флуорометра Qubit 2.0 (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США). Перед синтезом кДНК 1 мкг общей РНК обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКазы (Thermo Scientific, EN0521), в течение 30 мин при 37 °C.

Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени

Накопление транскриптов *RPNIa*, *RPNIb* и *ACTINI* измеряли с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, как описано Köhler et al. (2003) с детекцией при помощи анализа Sybr Green Assay, в качестве эталонного гена использовали *18S рРНК* (ABI PDAR) или *ACTINI*. Использовали одну двадцать четвертую часть препарата кДНК в концентрации 384 нМ в реакционном объеме 26 мкл. Реакцию ПЦР и количественные измерения проводили с помощью системы обнаружения последовательностей ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) в стандартных условиях. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях. Специфичность уникального ампликона определяли путем анализа кривой плавления в соответствии с инструкциями производителя. Продукты ПЦР клонировали и затем секвенировали. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы охватывать соединение экзон-экзон для гарантии специфичности амплификации кДНК. Последовательности прямого и обратного праймеров приведены ниже, а их положение в кДНК относительно стартового кодона указано в скобках: *RPNIa*, 5'-CACAGATTTCGGAAGTTGCCA-3' (+2094) и 5'-TGGAGAGGTTCCGAAGCATC-3' (+2194); *RPNIb*, 5'-CTGACTCAACCAGTGGATCGG-3' (+1176) и 5'-STAGTCCGGTCTCCACATCCC-3' (+1293); *ACTINI*, 5'-GAGACTTTCAATGCCCCTGC-3' (+379) и 5'-CCATCTCCAGAGTCGAGCACA-3' (+479).

ОТ-ПЦР проводили на суммарной РНК, выделенной из соцветий и стручков растений арабидопсиса *pMEA::MEA-YFP* гетерозиготных мутантов *Col-0* и *cul4-2*, использовали следующие праймеры:

MEA, 5'-GCAGGACTATGGTTTGGATG-3' и 5'-CACSTTGAGGTAACAATGCTC-3' *YFP*, 5'-ATATCATGGCCGACAAGCA-3' и 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3';

ACTIN2, 5'-CTTGCACCAAGCAGCATGAA-3' и 5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT-3'; *GAPDH*: 5'-TTGGTGACACAGGTCAAGCA-3' и 5'-

АААСТТГТСТСААТГСААТС-3'. Среднее значение трех повторностей было нормализовано с использованием генов *ACTIN2* (AT3G18780), *GAPDH* (AT3G26650) в качестве внутреннего контроля. Все праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения PrimerExpress в соответствии с рекомендациями Applied Biosystems.

Для *Boechera* реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием 1 мкг общей РНК и кита для выполнения обратной транскрипции кДНК высокой производительности (4368814; Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Экспрессию генов *CENH3* и *APOLLO* анализировали с помощью системы ПЦР в реальном времени 7500 (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Эффективность праймеров оценивали с помощью стандартной кривой, использовали только праймеры с эффективностью 90–100%. В качестве эндогенного контроля использовался ген *UBQ* (полиубиквитин). Контроль без матрицы (вода вместо матрицы) и ОТ (вода вместо фермента обратной транскриптазы при синтезе кДНК) показал отрицательную амплификацию. Последовательности праймеров были следующими: *BOECHUBQ_F*: 5'-GGСТААГАТССАГГАСААГГААГГТАТ-3', *BOECHUBQ_R*: 5'-СТГГАТГТТАТАГТСАГССАААГТГСГ-3' для амплификации *UBQ*; *APOLLO_F*: 5'-СГГАГТТСТСТГСАСТАС 3' и *APOLLO_R*: 5'-ТТСТССТГТГГААТГТСГ-3' для анализа *APOLLO*; *Cenh3_F* 5'-СААСТСААСТТСАССАГСТАСТГ-3' и *Cenh3_R* 5'-ТТГТГААСТТГТГГСАТАТАТС-3' для анализа *CENH3*. Все реакции проводили в трех биологических и трех технических повторностях. Реакционная смесь состояла из 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems-4367659), 0,6 мкл праймеров (10 мкМ сток), 1 мкл матрицы кДНК (50 нг/мкл), 7,8 мкл воды без нуклеазы. Программа циклов ПЦР была следующей: предденатурация при 95°C в течение 10 мин, денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг при 60°C в течение 30 с и элонгация при 72°C в течение 60 с, 40 циклов. Данные анализировали

с помощью программного обеспечения Express Suite (Applied Biosystems) методом $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Нозерн-блот анализ

РНК экстрагировали с использованием реагента TRIzol (Gibco BRL, Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния, США). На дорожку геля закладывали 15 мкг общей РНК. Процедура гель-блоттинга РНК описана в Genschik et al., 1998. Целостность и количество РНК, нанесенной на каждую дорожку, проверяли окрашиванием бромистым этидием. В качестве зонда использовали фрагмент кДНК размером 464 п.н., меченный α - ^{32}P dCTP, соответствующий N-концевому кодирующему участку AtCul3B, полученному с помощью набора для случайной прайм-метки Prime-a-Gene (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин, США).

Блот-анализ белкового геля

Стручки арабидопсиса, содержащие зародыши на глобулярной и сердечковидной стадиях гомогенизировали в экстракционном буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 15 мМ MgCl₂, 15 мМ EGTA, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20, 1 мМ DTT в смеси ингибиторов протеаз (Roche Molecular Biochemicals) с использованием миксера Silamat S5 (Ivoclar Vivadent) и далее центрифугировали при 20000 g. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка Bio-Rad. 20 мкг белков на образец разделяли на 15% геле SDS-PAGE и переносили на мембрану Immobilon-P (Millipore). Для обнаружения убиквитин-белковых конъюгатов использовали коммерческие кроличьи поликлональные антитела (каталожный номер UG9510; Affinity Research Products) в разведении 1:1000. В качестве контроля загрузки использовали белок плазматической мембраны AtPIP2b, используя антитело против PIP2 в разведении 1:1000. Иммунореактивные белки выявляли с использованием антикроличьих антител, полученных у коз,

конъюгированных с пероксидазой (Sigma-Aldrich), и системы блот-анализа белков субстрата продленного действия SuperSignal West Dura (Socochim).

Для выявления *CUL3* использовали поликлональные кроличьи антитела к катанину (лаборатория M Vantard) в разведении 1:1000. Аффинно очищенное поликлональное антитело кролика Cdc2 (PSTAIRE) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Крус, Калифорния, США) использовали в разведении 1:4500. Для иммунодетекции белков из измельченного растительного материала использовали денатурирующий буфер (Büche et al., 2000). Двадцать микрограммов экстрактов общего белка разделяли с помощью SDS-гелей и наносили на мембрану Immobilon-P (Millipore, Бедфорд, Массачусетс, США). Иммунореактивные белки выявляли с использованием конъюгированных с пероксидазой антикроличьих антител козы (Dianova, Chalfont St Giles, Bucks, UK) и системы анализа вестерн-блоттинга ECL от Amersham.

Для исследования белков *CUL4* и *MSI1* общий белок экстрагировали из стручков растений Col-0 и *cul4* на 1, 2 и 3 ДАП с использованием денатурирующего буфера, как описано у Büche et al (2000). 40 мкг экстракта общего белка разделяли на геле SDS-PAGE и наносили на мембрану Immobilon-P (Millipore). Белок *MSI1-RFP* был обнаружен с использованием анти-DsRed-антитела (Clontech Laboratories Cat # 632496), разбавленного 1:1000 (объемное соотношение), тогда как белок *MEA-YFP* был идентифицирован с использованием поликлонального антитела кролика против GFP, разведенного 1 :10 000 (объемное соотношение).

Гибридизация in situ

Цветочные почки и стручки арабидопсиса фиксировали несколько часов в 4% параформальдегиде в 1x PBS с 0,1% Tween 20, обезвоживали с помощью серии спиртов и последующей серией растворов HistoClear (National Diagnostics, Атланта, GA, США) и заливали в Paraplast Plus (Sigma), Сент-Луис, Миссури, США). Гибридизацию проводили на срезах толщиной 10 мкм. Срезы очищали с помощью HistoClear, промывали серией спиртов, расщепляли протеиназой K. Для

постфиксации препараты обрабатывали в PBS (pH 7), затем в 0,1 М триэтаноламине и уксусном ангидриде. Для синтеза зонда *RPN1a* (At2g20580) использовались праймеры 5'-САТТССТСТГ-ТСГССААТАС-3' и 5'-GTCAGGTCАТАСАААGATCC-3', охватывающие область с 5910 по 6113 (203 п.н.) последовательности *RPN1a*, для амплификации соответствующего фрагмента кДНК арабидопсиса. Для амплификации фрагмента, специфичного для *RPN1b* (At4g28470), использовали праймеры 5'-ТТGААGАААGА-GAGAGAGCC-3' и 5'-GGATTTGGAAACTTATCCAGC-3', охватывающие область с 3108 по 3301 (193 п.н.). Фрагменты ДНК обоих генов встраивали в плазмиду pKS (Stratagene). Для синтеза зонда *CUL3A* (At1g26830) использовали полноразмерную кДНК последовательности *CUL3A*. Для синтеза зонда *CUL4* использовали фрагмент, охватывающий участок кДНК *CUL4* (At5g46210) с 1501 по 2000 (500 п.н.) последовательности. Фрагменты встраивали в плазмиду pGemT (Promega). Последний был гидролизован на фрагменты 150 п.н., которые встраивали в плазмиду pGEM-T (Promega). Смысловые и антисмысловые рибозонды, меченные дигоксигенином-УТР, были созданы путем транскрипции с использованием РНК-полимераз Т7 и Sp6 в соответствии с протоколом производителя (Roche Diagnostics). Гибридизацию проводили на срезах Paraplast Plus (Sigma-Aldrich) толщиной 10 мкм. Срезы гибридизовали с DIG-меченым соответствующим специфическим рибозондом с последующей промывкой SSC различной жесткости. Затем срезы блокировали в блокирующем буфере, уравновешенном 1% раствором BSA. Гибридизационный сигнал обнаруживали по связыванию антидигоксигенин-щелочной фосфатазы-связанного антитела и проявляли с помощью субстрата, окрашивающего раствора, свежего NBT. Когда реакция окрашивания завершалась, предметные стекла дважды промывали ТЕ-буфером для остановки реакции.

Экспрессия слитого белка циклин B1;1-GUS на фоне мутанта rpn1a-1

Мутант *rpn1a-1* был скрещен с гомозиготной линией, содержащей трансген, полученный из pCDG (Colon-Carmona et al., 1999), где промотор CysB1;1 плюс последовательности, кодирующие первые 150 аминокислот CysB1;1, включая блок разрушения циклина, были слиты в рамке считывания с геном *uidA*, кодирующим GUS. Семена этой линии были любезно предоставлены John Celenza. Семена F2 окрашивали на активность GUS, как описано (Rodrigues-Pousada et al., 1993); после окрашивания образец просветляли в соответствии с протоколом Yadegari et al. (1994) и исследовали под микроскопом Leica DMR.

Дрожжевой двухгибридный анализ

кДНК DDB2 и MSI1 были слиты с доменом активации GAL4, а кДНК DDB1A, слитая с доменом связывания GAL4, соответственно, и клонированы в совместимые с Gateway pGAD424gate и pGBT9gate (коллекция плазмид Гента, <http://bccm.belspo.be/index.php>) двугибридные векторы дрожжей. Штамм дрожжей AH109 (Clontech) трансформировали подходящими комбинациями векторов. Трансформанты отбирали на синтетических (SD)/-Leu/-Trp (-LW) средах, а далее тестировали взаимодействия на SD/-Leu/-Trp/-His (-LWH) или SD/-Leu/-Trp/-Ade (-LWA) средах, выращивая культуру в течение 4 дней при 28°C.

Глютатион-S-трансферазный анализ

Полноразмерную кДНК гена *DDB1A* клонировали в вектор Gateway pDEST15 (Invitrogen) путем рекомбинации для экспрессии в *Escherichia coli* BL21AI (Invitrogen). В этой конструкции глютатион-S-трансфераза (GST) была помещена в рамку на N-конце белка DDB1A. Через 4 часа после индукции 0,2% арабинозой при 161°C слитые белки очищали на глютатион-сефарозе в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Для глютатион-S-

трансферазного анализа белки DDB2 и MSI1 транслировались *in vitro* с использованием системы экстракта зародышей пшеницы, связанной с TNT7 (Promega), и метили радиоактивным изотопом ^{35}S -метионином. Очищенные GST-DDB1A и контрольные белки GST, иммобилизованные на гранулах глутатион-сефарозы, инкубировали в течение 2 часов при 41°C с равными количествами белков DDB2 и MSI1, меченных ^{35}S -метионином, в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Меченые белки DDB2 и MSI1 выявляли с помощью автордиографии.

Бимолекулярная флуоресцентная комплементация

Кодирующие последовательности *DDB1A*, *DDB2* и *MSI1* клонировали в сплит векторы назначения YFP путем рекомбинации (Invitrogen) с целью получения конструкций *YN-DDB1A*, *YC-DDB2* и *YC-MSI1*. Эксперименты с векторами YN-, YC- и ^{35}S -CPRF2-CFP и разделением YFP проводились, как описано в Stolpe et al., (2005). В качестве отрицательного контроля использовали векторы, несущие YN или YC либо сами по себе, либо слитые с BPM3 (At2g39760). Изображения фиксировали через 20 часов после бомбардировки с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Nikon E800, оснащенного иммерсионной оптикой $40\times$ с использованием фильтров, специфичных для CFP и YFP.

Эксперименты по иммунопреципитации

Суммарные растворимые белки экстрагировали из растений *pMSI1::MSI1-RFP* (Chen et al., 2008) с использованием буфера А (100 мМ NaHPO_4 , pH 8,0, 1% Triton \times 100, смесь ингибиторов протеаз (Complete; Roche Molecular Biochemical)). Анализ иммунопреципитации проводили с использованием поликлонального антитела против CUL4, связанного с гранулами протеина-сефарозы. Белок MSI1-RFP выявляли с помощью анти-DsRed-антител (Clontech Laboratories Cat # 632496), разбавленных 1:1000 (соотношение объемов).

Иммунопреципитация хроматина

Эксперименты с ChIP проводили согласно описанию Jiang et al., (2008), с использованием молодых цветков до оплодотворения и молодых стручков около 3 ДАП, а также 17-дневных растений. После связывания ДНК с белками благодаря применению формальдегида, ткани измельчали в порошок, использовали порции смешанной ткани объемом 5 мл. Подготовка хроматина, обработка ультразвуком и иммунопреципитация с помощью антител против H3 (05-499; Millipore), против триметилгистона H3K27 (07-449; Millipore) и против ацетил-H3 (06-599; Millipore) проводили с использованием набора Millipore ChIP в соответствии с инструкциями производителя. Иммунопреципитированную ДНК анализировали методом кПЦР в реальном времени с праймерами для *MEA* (регион 700–1500; Varoux et al., 2006). Праймеры *FUSCA* (Kwon et al, 2009) использовали в качестве внутренних стандартов для нормализации. Анализ данных проводился, как описано в Mutskov и Felsenfeld (2004). Эксперимент проводили трижды для каждого биологического образца.

Поиск в базе данных и анализ последовательности

Последовательности ДНК анализировали с использованием локально установленного сервера BLAST (Altschul et al., 1997) по общедоступным и локальным базам данных нуклеотидов и белков. Детальный анализ был выполнен с помощью пакета программного обеспечения для анализа последовательности GCG версии 10.1, пакета EMBOSS (Rice et al., 2000) и с помощью точечной диаграммы (DOTTER; Sonnhammer, Durbin, 1995). Физическое расположение генов в геноме арабидопсиса определяли с помощью карт, доступных на информационном ресурсе для арабидопсиса (<http://www.arabidopsis.org/>). Данные о хромосомных дупликациях арабидопсиса можно найти по ссылке <http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup>. Информация об экспрессии *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*,

CUL3b и других генов была найдена на сайте UNIGENE из GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/UniGene>).

Поиск в базах данных и биоинформатическая предобработка генов APOLLO и CENH3

Последовательности генов *APOLLO* (аспаратат-глутамат-аспаратат-аспаратат-гистидинэкзонуклеаза) и *CENH3* (гистон-Н3-подобный центромерный белок) у различных видов *Boechnera* были взяты из источников, перечисленных в табл. 35 (см. также в Brukhin et al., 2019). Для филогенетического анализа *APOLLO* дополнительно использовали 10 линий, описанных в (Corral et al., 2013) и перечисленных в табл. 36 (5 апо-аллелей, 5 секс-аллелей).

Таблица 35 - Данные секвенирования геномов исследованных видов *Boechnera*

Вид	Способ размножения	Сырые данные Код в NCBI	Геном собран	Геном аннотирован	Ссылка
<i>B. stricta</i>	Половая	SRR396760	да	да	(Lee et al., 2017)
		SRR396762			
<i>B. retrofracta</i>	Половая	SRR396756	да	да	(Kilver et al., 2018)
		SRR3929707			
<i>B. puberula</i>	Половая	ERX2578777	да	нет	(Kiefer et al., 2019)
		ERX2578776			
<i>B. spatifolia</i> (Rosita3)	Половая	SRR5116719	да	нет	(Lovell et al., 2013)
<i>B. spatifolia</i> (Tiesiding2)	Половая	SRR5116723	нет	нет	(Lovell et al., 2013)
<i>B. spatifolia</i> (Chicago2)	Половая	SRR5116732	нет	нет	(Lovell et al., 2013)
<i>B. spatifolia</i> (Royal2)	Половая	SRR5116730	нет	нет	(Lovell et al., 2013)
<i>B. arcuata</i>	Половая	SRR6448790	нет	нет	n/a
<i>B. divaricarpa</i>	Апомиктичная	SRR3500627	нет	нет	n/a
		SRR3500628			
<i>B. perennas</i>	Апомиктичная	SRR6448882	нет	нет	n/a

Для видов, находящихся в открытом доступе, с собранными и аннотированными геномами был осуществлён BLAST поиск данных для переэкстрагированных белков с использованием в качестве запроса пептидных последовательностей *A. thaliana*. Для остальных видов (все линии *B. spatifolia*, описанные в (Lovell et al., 2013), а также линии *B. arcuata* и *B. divaricarpa*)

выполняли локальную сборку с использованием SRAssembler v1.0 (McCarthy et al., 2019). Воспроизводимость результатов сборки локусов проверяли с помощью метода для полногеномной черновой сборки с использованием программного обеспечения Platanus v1.2.1 (Kajitani et al., 2014) с последующим поиском генов с помощью Exonerate v2.2, запущенного в режиме protein2genome (Slater, Birney, 2005). Все упомянутые выше инструменты запускали с параметрами по умолчанию.

Таблица 36 - Линии *Voechera*, использованные для исследования гена *APOLLO* (Corral et al., 2013)

Линия в GenBank	ID образца	Тип аллели
KF705583.1	369S2_S3	Sex-allele
KF705582.1	376S2_S5	Sex-allele
KF705581.1	355S2_S3	Sex-allele
KF705569.1	329S2_S1	Sex-allele
KF705572.1	385S2_S11	Sex-allele
KF705596.1	43A3_A3	Apo-allele
KF705598.1	1A2_A6	Apo-allele
KF705600.1	11A2_A1	Apo-allele
KF705599.1	11A2_A3	Apo-allele
KF705588.1	33A2_A5	Apo-allele

Результирующие параметры полученных сборок перечислены в таблице 37. Как видно, эти сборки имеют довольно скромные характеристики N50, порядка нескольких kB (Brukhin et al., 2019). Недостаточное покрытие геномов (в среднем 30 кратное), малая длина ридов и высокая сложность геномов явились причиной того, что большинство линий *B. spatifolia*, о которых сообщалось в (Lovell et al., 2013), были исключены из дальнейшего анализа. В исключенных данных было обнаружено значительное расхождение полученных последовательностей произведённых двумя методами сборки и аномально низкое их сходство с гомологами у других видов Brassicaceae. Таким образом, для анализа *CENH3* была включена только линия Rosita3. Для анализа *APOLLO* были включены линии Rosita3, Tiesiding2, Chicago2 и Royal2. В сборках *B. puberula* и *B. perrenas* наблюдали неполный ген *APOLLO*, поэтому эти виды также были исключены из дальнейшего генетического анализа. Стоит отметить, что малая длина ридов не позволила осуществить достоверные диплоидные сборки и различить разные

копии и аллели рассматриваемых генов, потенциально присутствующие в геномах. Таким образом, весь последующий анализ проводили с консенсусными вариантами собранных генов. Последовательности для видов, отличных от *Boecheera*, были взяты из баз данных Phytozome v. 12.1 (Goodstein et al., 2012) и Uniprot (UniProt Consortium, 2019).

Таблица 37 - Список характеристик сборок геномов *Boecheera*.

Линия	Длина сборки, Mb	N50, Kb	Самый большой контиг, Kb
<i>B. spatifolia</i> (Alvarado1_2)	132,8	2,3	23,4
<i>B. spatifolia</i> (Alvarado1_3)	132,4	3,2	27,7
<i>B. spatifolia</i> (Alvarado2_1)	97,6	1,05	11,8
<i>B. spatifolia</i> (Alvarado2_2)	129,7	2,02	19,3
<i>B. spatifolia</i> (Chicago2)	137,9	8,3	72,8
<i>B. spatifolia</i> (Chicago4)	146	2,6	22,9
<i>B. spatifolia</i> (Chiquito4)	150,6	3,9	35,4
<i>B. spatifolia</i> (Chiquito7)	133,5	1,9	16,4
<i>B. spatifolia</i> (Cripple6)	158,9	13,8	139,8
<i>B. spatifolia</i> (Cripple7)	146,5	3,1	23,7
<i>B. spatifolia</i> (Rosita3)	140,9	15,5	137,8
<i>B. spatifolia</i> (Rosita4)	146,7	3,2	27,6
<i>B. spatifolia</i> (Royal1)	146,4	2,8	23,8
<i>B. spatifolia</i> (Royal2)	155,7	13	123,6
<i>B. spatifolia</i> (Tiesiding2)	144,7	6,1	70,8
<i>B. spatifolia</i> (Tiesiding7)	146,8	1,5	15,2
<i>B. perrenas</i>	510	3,6	157,6
<i>B. divaricarpa</i>	299,1	7	113,5

Общая характеристика гена *CENH3*

Длина гена *CENH3* и структура экзонов были взяты из выходных данных SRAssembler и Exonerate. Молекулярную массу и изоэлектрическую точку белков

рассчитывали с помощью сервера ExPASy ProtParam (Gasteiger et al., 2005). Субклеточная локализация белков *Boecheira* была предсказана с помощью CELLO v.2.5: предиктор субклеточной локализации (Yu et al., 2006). Консервативные области исследовали с помощью CDD (Conserved Domain Database) (Marchler-Bauer et al., 2015). Промоторные области анализировали на наличие регуляторных мотивов с использованием базы данных PLANTCARE (Lescot et al., 2002).

Эволюционный анализ генов CENH3 и APOLLO

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли с помощью алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004), а затем визуализировали с помощью Jalview v2 (Waterhouse et al., 2009). Эволюционная история рассчитывалась методом максимального правдоподобия и w/freq. модель (Jones et al., 1992). В результате было реконструировано дерево с наибольшей логарифмической вероятностью. Рядом с ветвями отражен процент деревьев, в которых кластеризовались ассоциированные таксоны (всего было выполнено 1000 итераций). Дерево изображено в масштабе, длину ветвей измеряли количеством замен на сайт. Эволюционный анализ был проведен в MEGA X (Kumar et al., 2018). Визуализация тепловой карты выполнена с помощью пакета R Pheatmap (Kolde, 2021).

*Стратегия секвенирования *B. retrofracta**

Геном *B. retrofracta* был секвенирован в рамках проекта JGI Community Sequencing Project для получения данных геномных последовательностей растений из рода *Boecheira* (<http://jgi.doe.gov/why-sequence-boecheira-holboellii/>). Были сконструированы и секвенированы шесть библиотек с использованием трех платформ, включая Illumina, Roche и Sanger: одна библиотека ридов с парными концами (PE), четыре библиотеки mate pairs (MP) и одна концевая библиотека бактериальной искусственной хромосомы (BAC), секвенированной по Сенгеру.

Длина ридов и фактические размеры вставок для каждой библиотеки приведены в таблице 38. Эта схема секвенирования была специально разработана для начальной сборки контигов ассемблером DISCOVAR (Weisenfeld et al., 2014) с последующим созданием скаффолдов. Конструирование геномных библиотек и секвенирование выполняли в соответствии с Lee et al. (2017).

Таблица 38 - Схема секвенирования генома *B. retrofracta*

ID	Тип библиотеки	Платформа	Длина ридов	Средний размер вставки, п.н.	Количество пар ридов
LIB400	paired ends	Illumina	250	402	189788627
LIB4000R	mate pairs	Roche	-	4 014	3259085
LIB5000	mate pairs	Illumina	150	4 877	19083787
LIB7000	mate pairs	Illumina	150	6 882	34066282
LIB24000R	mate pairs	Roche	-	24 332	672098
BES	BAC end sequencing	Sanger	-	147 708	17775

Сокращения: BAC, искусственная бактериальная хромосома; BES, BAC концевые последовательности.

Фильтрация необработанных данных и предварительная обработка

Фильтрацию библиотеки PE LIB400 проводили в два этапа. Сначала с помощью Cookiecutter (Starostina et al., 2015) удалялись риды, содержащие длинные фрагменты адаптеров. Затем с помощью Trimmomatic (Bolger et al., 2014) были отфильтрованы риды с короткими фрагментами адаптеров. Однако в соответствии с условиями работы программы DISCOVAR на этих двух стадиях не выполнялась обрезка и качественная фильтрация. Отбрасывались только целые риды, загрязненные адаптерами.

Для обработки библиотек, полученных с помощью Illumina MP LIB5000 и LIB7000, инструмент NextClip (Leggett et al., 2013) был модифицирован как и для работы с библиотеками Cre-Lox. Важно отметить, что исходный NextClip использует очень простой алгоритм для выравнивания последовательностей линкера на риды. Учитывается только количество совпадающих оснований. Поскольку линкер CreLox значительно длиннее линкера Nextera, количество ложных срабатываний может существенно возрасти. Чтобы смягчить этот эффект,

для выравнивания было добавлено требование наличия непрерывной последовательности из 9 п.н. Модифицированный инструмент получил название CreClip и его можно найти по ссылке <https://github.com/mahajrod/CreClip>.

Риды из библиотек Roche MP Libraries LIB4000R и LIB24000R были разделены на «прямой» и «обратный» сегменты, разделенные линкером. Затем с «обратных» сегментов с помощью Trimmomatic были отрезаны некачественные концы. Наконец, для имитации библиотеки Illumina MP обратные сегменты были обратно дополнены.

Оценка размера генома

Оценка размера генома на основе распределения 23-меров (а также другой статистики на основе k-меров) была выполнена с использованием программного обеспечения KrATER (Kliver et al., 2017) на библиотеке LIB400 и в дальнейшем сравнивалась с предыдущими оценками размеров генома растений из рода *Boechera* (Anderson et al., 2011b).

Сборка генома и оценка качества

На этапе сборки исходные контиги конструировали из отфильтрованных ридов LIB400 с помощью DISCOVAR. Затем полученные контиги были расширены с использованием библиотеки *BAC end sequencing* (BES) и скаффолдера SSPACE (Boetzer et al., 2010).

Перед скаффолдингом была проведена оценка фактического (среднего) размера вставки. Отфильтрованные риды из всех библиотек были выравнены на исходные контиги с помощью BWA (Li, Durbin, 2009). Для каждой библиотеки при оценке использовали только выравнивания на контиги с 3-кратной длиной целевого размера вставки (таблица 27), чтобы свести к минимуму артефакты выравнивания. Далее расширенные контиги использовали для построения скаффолдов с помощью SSPACE в два этапа: на первом этапе для получения сырых

скаффолдов использовали все четыре библиотеки МР (LIB4000R, LIB5000, LIB7000, LIB24000R), на втором этапе сырые скаффолды линковали с

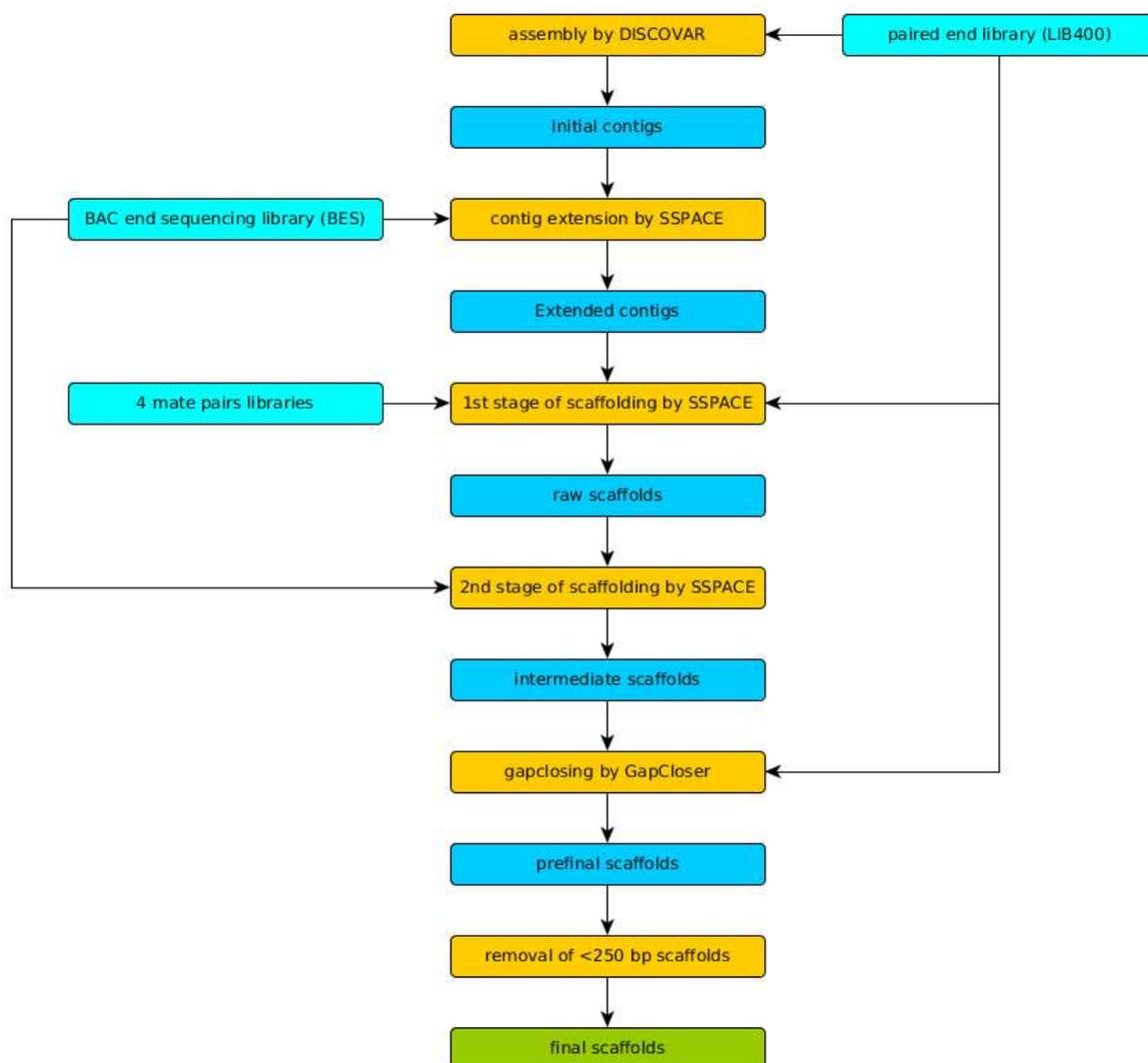


Рисунок 82 - Пайплайн, использованный для сборки генома *Boechera retrofracta*.

промежуточными скаффолдами с использованием только библиотеки BES. Скаффолды создавали в несколько этапов, поскольку для использования данных BES требовались разные варианты. Закрытие гэпов в промежуточных скаффолдах выполняли с помощью GapCloser (модуль для SOAPdenovo2) (Luo et al., 2012) только в библиотеке LIB400. Все скаффолды длиной менее 250 п.н. (т. е. меньше длины ридов LIB400, библиотеки, используемой для построения начальных контигов) были отфильтрованы, так как соответствующие короткие фрагменты,

скорее всего, являются артефактами сборки. Целостность сборки была проверена с помощью SEGMA (Parra et al., 2007) и BUSCO (Simão et al., 2015). Схема сборочного конвейера представлена на рисунке 82.

Анализ повторов

Идентификацию повторов de novo в геноме *B. retrofracta* проводили с помощью RepeatModeler (Smit et al., 2008–2015) с параметрами по умолчанию. Полученную библиотеку повторов объединяли с повторами *A. thaliana* из RepBase (Bao et al., 2015), а объединенную библиотеку использовали для аннотирования повторов с помощью RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Затем повторы в геноме *B. retrofracta* были маскированы с помощью Bedtools (Quinlan, Hall, 2010) для предсказания генов, кодирующих белок. Также было выполнено маскирование tandemных и рассеянных повторов с помощью TRF (Benson, 1999) и Windowmasker (Morgulis et al., 2005) соответственно.

Определение вариантов и генотипирование

Для определения геномных вариантов и генотипирования отфильтрованные риды выравнивали на собранный геномом с использованием BWA mem с параметрами по умолчанию. Затем для определения вариантов использовали конвейер GATK (Van der Auwera et al., 2013) следующим образом: дубликаты были помечены с помощью Picard MarkDuplicates, риды выравнивали вновь по инделам (Indels) и, наконец, для выявления вариантов использовали HaplotypeCaller. Оставляли только одиночные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) и инделы (Indels), соответствующие следующим критериям фильтрации: QualByDepth (QD) > 2,0, FisherStrand (FS) < 20,0, RMSMappingQuality (MQ) > 40,0, MappingQualityRankSumTest (MQRankSum) > -12,5, ReadPosRankSumTest (ReadPosRankSum) > -8,0 для SNP и QualByDepth (QD) > 2,0, FisherStrand (FS) < 20,0, ReadPosRankSumTest (ReadPosRankSum) > -20,0 для инделов соответственно.

Наконец, были исключены варианты, попадающие в повторы, замаскированные RepeatMasker.

Предсказание генов, кодирующих белок и нкРНК

Предсказание генов, кодирующих белок, было выполнено с использованием комбинированного подхода, объединяющего предсказания, основанные на гомологии, и предсказания de novo, при этом последнее использовали только для заполнения пробелов и расширения предсказаний, основанных на гомологии. Чистые предсказания de novo отфильтровывали.

В качестве доказательства присутствия генов на основе гомологии мы использовали белки и транскрипты 5 близкородственных видов из семейства Brassicaceae. Белки четырех эталонных видов – *Arabidopsis thaliana* (сборка TAIR10), *Brassica rapa* (Brapa_1.0), *Capsella rubella* (Caprub1_0) и *Eutrema salsugineum* (Eutsalg1_0) были сопоставлены со сборкой *B. retrofracta* с помощью программы Exonerate (Slater, Birney, 2005) с использованием модели protein2genome с максимум тремя хитами на белок. Полученные выравнивания классифицировали на высокие (первичные) и вторичные хиты; у фрагментов кодирующей последовательности (CDS) вырезали с каждой стороны по 3 п.н. для первичных хитов и по 9 п.н. для вторичных хитов. Транскрипты *B. stricta* (сборка v1.2, (Lee et al., 2017)) с маркированными участками CDS также были выровнены на геном *B. retrofracta* с помощью Exonerate с использованием модели cdna2genome, оставляя другие варианты без изменений. Выравнивания сегментов CDS не сокращались для главных хитов, но сокращалось на 3 п.н. для второстепенных хитов.

Полученные укороченные фрагменты были сгруппированы и предоставлены в качестве указаний для обработки программным пакетом AUGUSTUS (Stanke et al., 2006), а CDS-сегменты генов были предсказаны в маскированной сборке *B. retrofracta* с использованием моделей генов *A. thaliana*. Белки были транслированы с предсказанных генов и сопоставлены с помощью HMMER 3.1 (Johnson et al.,

2010) и BLAST (Altschul et al., 1990) с базами данных Pfam (Bateman et al., 2004) и Swiss-Prot (UniProt Consortium, 2017) соответственно. Сохраняли только гены, поддерживаемые как указаниями, так и попаданиями в одну из белковых баз данных; остальные гены были отброшены. Гены тРНК и рРНК были предсказаны с помощью tRNAscan-SE v1.3.1 (Lowe, Eddy, 1997) и Barrnap v0.6 (Victorian Bioinformatics Consortium. Barrnap, 2017) соответственно.

Филогенетический анализ

Самые длинные белки, соответствующие каждому предсказанному гену *B. retrofracta* и шести другим видам Brassicaceae – *B. stricta* (сборка v1.2), *A. thaliana* (TAIR10), *A. lyrata* (v.1.0), *C. rubella* (Caprub1_0), *Cardamine hirsuta* (v1.0) и *E. salsugineum* (Eutsalg1_0) — были выровнены на профиль HMM-моделей подмножества braNOG из базы данных eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2016) с использованием HMMER. Лучшие совпадения из выравниваний были извлечены и использованы для отнесения соответствующих белков к ортологичным группам с последующим выделением однокопийных ортологов.

Чтобы проверить соответствие топологии и получить основу для будущих исследований положительного отбора, была проведена реконструкция дерева видов. Однокопийные ортологичные белки семи видов, включенных в анализ, сопоставляли с помощью MAFFT (Katoh, Standley, 2013). На основе полученных выравниваний белков было реконструировано дерево максимального правдоподобия с помощью программы RAxML v8.2 (Stamatakis, 2014) с опцией PROTGAMMAAUTO, а модель подгонки JTT была протестирована посредством 1000 бутстрап-репликаций. Дерево было укоренено на *E. salsugineum* в качестве внешней группы. Результирующее дерево было построено с помощью программы FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Эволюционный анализ гена APOLLO

Эволюционную историю гена *APOLLO* выявляли с использованием метода максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней (Tamura, Nei, 1993). Первоначальное выравнивание соответствующих CDS выполняли с помощью *prank* v.140110 (Löytynoja, 2014) в режиме распознавания кодона. Было выбрано дерево с наибольшей логарифмической вероятностью (-12153,79) (рис. 61). Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием метода максимального составного правдоподобия (MCL), а затем выбора топологии с более высоким значением логарифмического правдоподобия. Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были устранены. Всего в окончательном наборе данных было 1158 позиций. Эволюционный анализ был произведен с помощью MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Полногеномное сравнение

В качестве предварительного шага для будущего полногеномного сравнения различных видов *Voechera* было выполнено полногеномное выравнивание с помощью Cactus Multiple genome aligner (Paten et al., 2011) и дальнейшая визуализация с помощью веб-инструмента ClicO FS (Cheong et al., 2015) на основе Circos (Krzywinski et al., 2009).

Конструкции TAP-тегов

Фрагмент ~300 п.н., содержащий сигнал полиаденилирования *rbcS-E9* гороха, включал сайты рестрикции *SalI* и *PstI* на концах ампликона, этот фрагмент был амплифицирован с помощью ПЦР с помощью праймеров oDB607+oDB626 и клонирован в pSAMBIA1300, в результате чего получался pDB588. Геномные

фрагменты арабидопсиса, содержащие *RRP4* (1,9 тыс. п.н., праймеры oDB611+oDB612) или *RRP41* (3,4 тыс. п.н., праймеры oDB617+oDB618), амплифицировали и сливали путем перекрывания с последовательностью TAP-метки, которая была амплифицирована из pBS1479 (Rigaut et al., 1999) с помощью праймеров oDB608+oDB609 (для *RRP4*) или oDB608+oDB610 (для *RRP41*). Полученные инсерции расщепляли *Bam*HI и *Sal*I (для *RRP4*) или *Bam*HI и *Xho*I (для *RRP41*) и клонировали в pDB588, линейаризованную с помощью *Bam*HI + *Sal*I, в результате чего образовывались pDB589 (*RRP4-TAP*) и pDB591 (*RRP41-TAP*) (Chekanova et al., 2007).

Протеомика

Протокол очистки TAP был адаптирован из работы Rigaut et al., 1999. Белковые бэнды, окрашенные кумасси, обрабатывали трипсином с использованием набора In-Gel Digestion Kit (Pierce), высушенные пептиды, растворенные в 50% ацетонитриле, 0,1% трифторуксусной кислоте с 5 мг /мл альфа-4-гидроксикоричной кислоты в качестве носителя 0,6 мкл смеси пептид/носитель загружали на плашку для образцов 6AB MALDI, сушили, разгоняли на MALDI-TOF MS с последующим анализом MS/MS с использованием 4700 Proteomics Analyzer и программного обеспечения GPS (Applied BioSystems). Комбинацию пептидного масс-фингерпринтинга (PMF) и анализа секвенирования MS/MS проводили с использованием поисковой системы Mascot. Фрагментацию предшественников осуществляли с помощью диссоциации, индуцированной столкновением (англ. Collision-Induced Dissociation, CID). Спектры CID использовали для идентификации белков с допустимой точностью предшественника 1Да и устойчивостью фрагментов MS/MS 0,5 Да. Критерием правильной идентификации белка был доверительный интервал, превышающий 95%, который представлял собой комбинацию оценки белка из PMF и оценки ионов MS/MS секвенирования (Chekanova et al., 2007).

Индуцибельная РНКи

Кассеты, используемые для РНК-интерференции, содержали 940 п.н. (*RRP4*) или 788 п.н. (*RRP41*) фрагменты целевой последовательности кДНК в виде пары инвертированных повторов, разделенных интроном *FAD2* на основе вектора pER8 (Zuo et al., 2000). Для индукции *uРНКи* проростки проращивали 7 дней на среде, содержащей 8 мкМ 17 β -эстрадиола (Chekanova et al., 2007).

Индуцируемые конструкции РНКи были созданы с использованием следующих шагов. Сначала интрон *FAD2* амплифицировали из геномной ДНК с использованием праймеров oDB731 и oDB732, расщепляли по сайтам *PspOMI* и *EagI*, в 5'-части добавляли праймеры для ПЦР и клонировали в pTA211 (Sanchez, Chua, 2001), выбирая прямую ориентацию клонов с использованием диагностической ПЦР с праймерами oDB725 и oDB732. На втором этапе полученную конструкцию (pDB608) использовали для вставки смыслового сегмента соответствующей кассеты РНКи (амплифицированной с oDB749 и oDB750 в случае *RRP4* или с oDB727 и oDB728 в случае *RRP41*) перед интроном *FAD2*, используя сайты рестрикции *AscI* и *BsrGI*. На следующем этапе одни и те же сегменты соответствующих кассет РНКи, амплифицированные с теми же праймерами, что и выше (oDB749 и oDB750 в случае *RRP4* или с oDB727 и oDB728 в случае *RRP41*), клонировали ниже интрона *FAD2* после расщепления ПЦР продукта рестриктазами *PspOMI* и *AscI* и расщепления вектора с помощью *PspOMI* и *MluI*. Наконец, всю кассету (целевой смысловый ген / интрон *FAD2* / интересующий антисмысловый ген) переносили в pER8 (Zuo et al., 2000) как фрагмент *AscI* - *PacI*. В конечных конструкциях соответствующие кассеты *uРНКи* располагались ниже минимального промотора 35S, содержащего восемь операторов *LexA*, и находились в одной Т-ДНК с геном, кодирующим управляемый промотором *G10-90* химерный трансактиватор *XVE* и маркер устойчивости к гигромицину.

Очистка экзосомного комплекса арабидопсиса

Протокол ТАР был адаптирован из Rigaut et al. (1999) с измененным буфером для экстракции в соответствии с Witte et al. (2004). Замороженную надземную ткань арабидопсиса (50 г для подготовительных экспериментов) измельчали в мелкий порошок с помощью ступки и пестика при температуре жидкого азота, смешивали с равным (мас./об.) количеством буфера для экстракции (0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, по 5 мМ ЭДТА и ЭГТА, 10 мМ ДТТ, 0,5% Triton X-100 и смеси ингибиторов протеаз) и оставляли оттаивать при комнатной температуре. Суспензию дополнительно измельчали с использованием Polytron (PowerGen) при максимальной настройке в течение 3-5 минут и дополнительно обрабатывали ультразвуком на льду с использованием импульсов 3×30 с. Экстракт осветляли 30-минутным центрифугированием при 20 000 г, фильтровали через два слоя miracloth, добавляли 10% (об./об.) глицерина и хранили при -80°C. Для очистки экзосом экстракт (45 мл) смешивали с 5 мл предварительно промытых агарозных бусинок IgG (Amersham) и инкубировали в течение 4 ч при 8°C с вертикальным вращением. Суспензию переносили в стеклянную колонку, промывали 4 x 30 мл промывочного буфера (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, по 5 мМ EDTA и EGTA, 2 мМ DTT, 0,05% Triton X-100) и уравнивали промывкой 2x30 мл буфером TEV (50 мМ Tris-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 2 мМ DTT, 0,05% Triton X-100). Расщепление инициировали ресуспендированием суспензии в 12,5 мл буфера TEV с добавлением 1000 U протеазы TEV (Invitrogen) и ингибитора цистеиновой протеазы E-64 (Sigma) в количестве, превышающем 10 мкМ. Расщепление продолжалось в течение нескольких часов при 8°C на вращающейся качалке. Колонку осушали, надосадочную жидкость разбавляли в 3 раза буфером для связывания кальмодулина (50 мМ Tris-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ имидазол, 1 мМ MgOAc, 2 мМ CaCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,05% Тритон X-100) и добавляли 75 мкл 1М CaCl₂. Затем смесь переносили в пробирку на 50 мл, содержащую 5 мл предварительно промытой кальмодулиновой смолы (Stratagene), и инкубировали еще 3-4 часа на вращающейся качалке при 8°C. Суспензию

переносили на стеклянную колонку, пропускали жидкость и промывали суспензию 2×5 мл буфером для связывания кальмодулина. Элюирование проводили с использованием модифицированного щелочного буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 25 мМ NaOH, 1 мМ имидазол, 1 мМ MgOAc, 5 мМ EGTA, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,01% Triton X-100). При этом высвобождались меченные СВР белки. Собранные фракции нейтрализовали добавлением равного объема буфера (150 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ имидазол, 1 мМ MgOAc, 25 мМ HCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол) и концентрировали с использованием микроконцентратора (Vivascience). Белки, полученные из экстрактов RRP4-TAP, RRP41-TAP и WT арабидопсиса, анализировали параллельно с использованием 15% SDS-PAGE и окрашиванием с помощью набора для коллоидного кумасси (Invitrogen).

Фракционирование экстрактов седиментацией в градиенте глицерина

Экстракты из 2–4 г проростков *Ws* или *cs14-2* получали путем измельчения быстрозамороженной ткани в жидком азоте с последующей экстракцией 3 объемами буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl pH 7,9, 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ EDTA и 5 мМ EGTA, 10 мМ DTT, 0,1% Nonidet-P40 и смесь ингибиторов протеазы (Sigma #P9599, разведение 1:100). После центрифугирования при 16000g 300 мкл каждого экстракта загружали в 12 мл линейного градиента 10-30% глицерина, приготовленного в том же буфере. Экстракты фракционировали путем седиментации при 36 000 об/мин в течение 24 часов с ротором SW-41 на препаративной ультрацентрифуге Beckman Optima L-90 K, параллельно фракционировали стандарты молекулярной массы (BSA, 66 кДа; алкогольдегидрогеназа, 141 кДа; β-амилаза, 210 кДа, ферритин селезенки лошади, 443 кДа и тиреоглобулин быка, 669 кДа). Двадцать четыре фракции по 0,5 мл собирали с помощью фракционатора AutoDensiFlow (Labconco); 30 мкл каждой фракции анализировали методом вестерн-блоттинга с аффинно-очищенными

поликлональными антителами против субъединицы RRP41 экзосомы арабидопсиса (Chekanova et al., 2000; 2007).

Гибридизация на микрочипах и их анализ

Для синтеза двухцепочечной кДНК с помощью набора для синтеза кДНК GeneChip One-Cycle (Affymetrix) использовали 15 мкг общей РНК, выделенной с помощью TRIzol (Invitrogen) (см. выше). Меченую биотином кРНК генерировали с помощью набора для маркировки GeneChip IVT и фрагментировали, а 15 мкг кРНК гибридизовали с мозаичными чипами для арабидопсиса (Zhang et al., 2006). Гибридизацию, окрашивание и отмывку проводили в соответствии с протоколом Affymetrix Eukaryotic Target. Для каждого из трех генотипов, пустого вектора (обозначаемого как WT), *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}* обработанных эстрадиолом или контролем (ДМСО) выполняли как минимум две повторности. Для анализа мозаичных чипов TileMap (Ji, Wong, 2005) использовали пакет программного обеспечения для обнаружения статистически значимых различий транскрипционной активности с помощью данных, полученных на мозаичных микрочипах, как описано в Zhang et al. (2006) и Chekanova et al. (2007).

Идентификация областей с дифференциальной экспрессией с использованием мозаичных микрочипов

Пакет TileMap, первоначально разработанный для анализа ChIP-on-chip (хроматин иммунопреципитация на чипе) (Ji, Wong, 2005), также может применяться для обнаружения и сравнения активности транскрипции данных, полученных на мозаичном микрочипе (Zhang et al., 2006). Алгоритм Tilemap не объединяет и не обрабатывает все зонды вместе в конкретном гене, а вместо этого рассматривает каждый зонд как отдельный объект. Следовательно, это программное обеспечение не сообщает об измерении изменений экспрессии на уровне гена, а обеспечивает непредвзятую идентификацию любых геномных

областей, которые могут соответствовать экзонам, интронам, межгенным областям и т. д., показывая значительное увеличение или уменьшение экспрессии.

Данные по трем генотипам, включенным в этот анализ, контрольная линия с пустым вектором (обозначаемой как WT), *rrp4^{iRNAi}* и *rrp41^{iRNAi}*, две обработки, эстрадиолом и ДМСО в качестве контроля (обозначаемые как +/- эстрадиол для краткости) и чипы, соответствующие двум цепочкам ДНК, Уотсона и Крика, обрабатывали следующим образом. Интенсивность признаков микрочипа для обоих повторов данной нокдаун линии, как с эстрадиолом, так и без него, а также контроль WT, обработанный эстрадиолом, были квантильно нормализованы и подвергнуты множественному сравнительному анализу TileMap. Например, в случае *rrp4^{iRNAi}*, данные всех шести повторностей мозаичного микрочипа (т. е. 2 повторности, обработанной эстрадиолом WT, 2 повторности, обработанной эстрадиолом *rrp4^{iRNAi}*, и две повторности *rrp4^{iRNAi}*, не обработанной эстрадиолом) одной цепи были одновременно квантильно нормализованы. Затем идентифицировали области с различной экспрессией путем сравнения WT, обработанного эстрадиолом и *rrp4^{iRNAi}* как обработанного эстрадиолом, так и без нее, для цепей Уотсона и Крика. В результате было получено два варианта: (1) *rrp4^{iRNAi}*, обработанные эстрадиолом > WT, обработанных эстрадиолом, PLUS *rrp4^{iRNAi}*, обработанные эстрадиолом > *rrp4^{iRNAi}*, не обработанных эстрадиолом, и (2) *rrp4^{iRNAi}*, обработанные эстрадиолом < WT, обработанных эстрадиолом, PLUS *rrp4^{iRNAi}*, обработанные эстрадиолом < *rrp4^{iRNAi}*, не обработанных эстрадиолом. В этих анализах использовали установку апостериорной вероятности 0,7 в пределах максимальной области 100 оснований. Сравнение *rrp4^{iRNAi}*, обработанных эстрадиолом > *rrp4^{iRNAi}*, не обработанных эстрадиолом, идентифицирует области с повышенной экспрессией благодаря нокдауну уровней белка Rgp4, а сравнение *rrp4^{iRNAi}*, обработанных эстрадиолом > WT, обработанных эстрадиолом, помогает удалить области с повышенной экспрессией благодаря только одному эстрадиолу. Аналогичным образом проводили анализ образцов *rrp41^{iRNAi}*. Объединенная сводка полученных данных показана на рисунке 48 Н и I. Анализ представленности

различных категорий Gene Ontology (GO) среди мишеней экзосомы был осуществлен с использованием GeneTools (Beisvag et al., 2006).

Чтобы оценить частоту ложноположительных результатов, которые могут быть индуцируемы или репрессируемы эстрадиолом *per se*, обе репликации для WT с обработкой эстрадиолом и без нее (т. е. 4 массива для цепи Уотсона и 4 массива для цепи Крика) нормализовали по квантилям и подвергали анализу TileMap. Области с дифференциальной экспрессией идентифицировали путем создания списков (WT с эстрадиолом > WT без эстрадиола и WT, обработанные эстрадиолом < WT без эстрадиола) с апостериорной вероятностью 0,7 в пределах максимальной области в 100 оснований, т. е. с теми же параметрами, которые использовали для сравнения нокдауна выше. Данный анализ не обнаружил областей с дифференциальной экспрессией. Более того, даже при более низком значении апостериорной вероятности, равной 0,5, можно было идентифицировать только шесть геномных областей (одну с положительной регуляцией и пять с отрицательной регуляцией), все на цепи Крика. Следовательно, при строгости статистических данных, использованных в нашей работе, любой эффект одного эстрадиола можно считать незначительными.

Скрининг семян методом проточной цитометрии (FCSS)

Для скрининга использовали стручки с незрелыми семенами. Наилучшие результаты получались, если семена содержали зародыши с изогнутыми семядолями (англ. walking stick) (см. рисунок 18 D). В пробирку типа эппендорфа объемом 1.5 мл добавляли 20 мкл буфера Отто I (Otto, 1990) (0,1 М моногидрат лимонной кислоты; 0,5 % (об. /об.) Tween 20; доводили объем до 200 мкл), куда пинцетом помещали одно незрелое зерно (для *B. stricta* и линии M4B), которое размалывали с помощью пестика. Затем добавляли 80 мкл буфера Отто II (0,4MNa₂HPO₄·12H₂O) и доводили объем до 200 мкл. Оба буфера до использования фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Полученную

суспензию семени фильтровали через фильтр Celltricks Partec (30мкм). Ядра из фильтрата анализировали на флуоцитометре (Sailer et al., 2015).

Скрининг семян *B. divaricata* (линия ES517) проводили в соответствии с протоколом (Delaat et al., 1987). Зрелые семена (в количестве 250) измельчали лезвиями бритвы в пластиковой чашке Петри на льду с 0,6 мл буфера для выделения ядер Partec (100 мМ Трис, 2,5 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 85 мМ NaCl, 0,1 % Тритон X-100) при pH 7,0. Для снижения влияния вторичных метаболитов, присутствующих в тканях растений, добавляли 15 мМ β -меркаптоэтанола и 1% PVP-40. После измельчения суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр 50 мкм. В пробирку с суспензией ядер добавляли флуорохром пропидиумйодит (PI) в концентрации 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, P4170) и РНКазу в концентрации 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, R6513), инкубировали в темноте на льду в течение 15 мин. Проточную цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Подсчет осуществляли с помощью синего лазера (488 нм) и оптического фильтра PE (585/42 нм). Было обработано 100 000 событий для каждого образца, затем путем гейтирования были исключены фрагменты клеточных стенок и прочие загрязненения, а также мультиплеты. Основой для измерения ploидности ядер являлось отношение интенсивностей флуоресценции последовательных событий.

Заключение

Процессы, связанные с размножением покрытосеменных, такие как образование цветочной меристемы, формирование из клеток нуцеллуса материнской клетки мегаспор или апоспоры (в случае апомиксиса), мейоз/апомейоз, гаметогенез, сопровождающейся формированием гаплоидного или диплоидного зародышевого мешка со спецификацией его клеток, оплодотворение яйцеклетки и центральной клетки, либо партеногенез, сопровождающийся формированием автономного или псевдогамного эндосперма (у апомиктов) и дальнейший эмбриогенез являются насущными направлениями исследований в биологии развития растений. Особый интерес и значение приобретает изучение генетической подоплеки, которая лежит в основе этих процессов, а также того, как происходит их молекулярная регуляция.

В XIX и XX веках был накоплен обширный материал, представляющий собой скрупулезные исследования структуры и развития зародышевых мешков, эмбриогенеза и апомиксиса у разных видов покрытосеменных на цитологическом и морфологическом уровне (Maheshwari, 1950; Хохлов, 1967; 1970; Солнцева, 1988; Поддубная–Арнольди, 1976; Яковлев, 1981; Петров, 1988; Johri et al., 1992; Naumova, 1993; Brukhin, Bozhkov, 1996; Tchorzewska et al., 1996; Brukhin et al., 2003; Brukhin, 2006 и другие), позже, благодаря скринингу природных и экспериментально полученных мутантов, в основном модельных растений арабидопсиса, кукурузы и риса, был достигнут значительный прогресс и в изучении женских гаметофитов цветковых растений на генетическом уровне, в том числе было обнаружено несколько десятков мутаций, связанных с формированием зародышевого мешка и эмбриогенезом (Sundaresan et al., 1995; Moore et al., 1997; Feldmann et al. al., 1997; Howden et al., 1998; Grossniklaus et al., 1998; Bonhomme et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2002; Grini et al., 1999; 2002; Ohad, et al., 1999; Moore, 2002; Lalanne et al., 2004; Pagnussat et al. , 2005; Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011; Brukhin, Baskar, 2019). Однако характеристика генов, ответственных за наблюдаемый фенотип, а тем более регуляция этих генов и их мишеней были

представлены в намного меньшем количестве исследований (Chaudhury et al., 1997; Grossniklaus et al., 1998; Huck et al., 2003; Kwee, Sundaresan, 2003; Köhler et al., 2005; Brukhin et al., 2005b; Thomann et al., 2005; Chekenova et al., 2007; Wuest et al., 2010; Dumbliauskas et al., 2011 и ряд других, см. обзор Ma, Sundaresan, 2010; Aslam et al., 2022). Не до конца решенными остаются и такие вопросы как – какие гены и локусы контролируют половой процесс и апомиксис, а именно, как происходит подготовка и переключение генетических программ клеток с вегетативного на репродуктивное развитие, как осуществляется позиционное решение того, какая из клеток нуцеллуса станет материнской клеткой мегаспор или апоспорой (в случае апоспорического апомиксиса), что запускает партеногенез в апомиктических яйцеклетках, каким образом решается проблема жизнеспособности семян при отклонении соотношений дозового эффекта материнских (m) геномов к отцовским (p) в эндосперме апомиктов от нормального соотношения $m:p = 2:1$, каковы различия половых и апомиктических видов на полногеномом уровне? На эти и многие другие вопросы репродукции растений, имеющие большое эволюционное и общебиологическое значение, предстоит ответить ученым. Настоящая диссертация сообщает об исследованиях, которые существенно восполняют этот пробел.

Произведенная нами коллекция инсерционных мутантов арабидопсиса с единичной вставкой транспозона *Ds* в геноме каждой линии позволила посредством двухэтапного скрининга отселектировать линии с дефектом репродукции, часть из которых, обнаружила нарушение развития зародышевого мешка или эмбриогенеза, что сопровождалось абортивностью семязачатков и/или семян. Фенотип шести из этих линий подробно изучен, при этом охарактеризованы гены, в которых была обнаружена вставка транспозона (Brukhin et al., 2011). Кроме того, произведенная коллекция позволила нам обнаружить ряд важных мутаций, связанных с деградацией сигнальных белков и репродукцией.

Среди различных регуляторных механизмов, контролирующих половое размножение у растений, особое внимание привлекает посттрансляционная регуляция посредством убиквитин-26S-протеасомного пути, направленного на

деградацию сигнальных молекул, отвечающих за клеточный цикл и формирование различных клеточных структур (Bolaños-Villegas et al., 2018; Saleme et al., 2021). Эта система представляет собой необратимый процесс, нацеленный на специфические, в основном регуляторные, белки с прикрепленными к ним E3 лигазами нескольких остатков убиквитина (Ub) для их дальнейшей пространственно-временной деградации, контролирующей количество или активность этих белков, необходимых, в том числе, и для нормального протекания репродуктивных процессов и развития растений (Vierstra, 2009; Ciechanover, Stanhill, 2014). В наших исследованиях мы подробно изучили влияние нарушения генов, кодирующих субъединицу RPN1 протеасомы 26S, а также куллиновых E3 лигаз CUL3 и CUL4, принадлежащих к убиквитин-протеасомной регуляторной системе, на эмбриогенез и формирование гаметофитов.

Мы впервые изучили субъединицу RPN1 протеасомы 26S у растений и у высших эукариот. Наши данные показывают, что активность субъединицы RPN1 у арабидопсиса является крайне важной для нормального эмбриогенеза, поскольку она может принимать участие в разрушении специфического набора белковых субстратов. Мутанты *rpn1* с потерей функции способны завершить гаметогенез и раннюю фазу эмбриогенеза, однако в гомозиготных *rpn1a* семенах эмбриогенез прерывался на глобулярной стадии, что сопровождалось накоплением циклина B1. Поскольку основная функция протеасомы 26S – это лизис убиквитинированных субстратов было удивительным, что двойной мутант *rpn1a rpn1b* преодолевал более ранние стадии, то есть стадии гаметогенеза и самое начало эмбрионального развития, так как сложно представить, что эти этапы жизненного цикла растений действительно требуют убиквитинирования без деградации, поэтому мы предположили, что протеасома 26S все еще, по крайней мере частично, функциональна во время гаметогенеза и на стадиях до глобулярного эмбриогенеза, а истощение ее активности приводит к остановке развития зародыша только на глобулярной стадии (Brukhin et al., 2005b).

Поскольку, убиквитинирование белков предшествует их разрушению протеасомой 26S мы решили исследовать мутации генов, кодирующих куллиновые

Е3 лигазы, *CUL3* и *CUL4*. Куллин-зависимые лигазы представляют собой мультисубъединичные ферменты, которые контролируют быстрое и избирательное расщепление важных регуляторных белков, в том числе и тех, которые участвуют в прогрессии клеточного цикла в репродуктивных процессах (Ciechanover et al., 2000; Thomann et al., 2005; Dumbliauskas et al., 2011). *CUL3* представлен двумя родственными генами, проявляющими функциональную избыточность в геноме арабидопсиса. Знания о функциях и субстратах лигаз *CUL3* остаются еще очень ограниченными. Наши исследования экспрессии обоих генов *CUL3* в репродуктивных тканях обнаружили, что паттерны их экспрессии перекрываются, что еще раз доказывает их избыточность. Было обнаружено, что гомозиготные мутантные растения *cul3b* развиваются нормально и остаются полностью фертильными, кроме того, нарушение обеих копий гена *CUL3* снижает гаметофитную передачу и вызывает гибель зародышей, которая находится под материнским контролем. Остановка развития зародышей происходит преимущественно на сердечковидной стадии. Кроме того, потеря функции *CUL3* влияет и на развитие эндосперма (Thomann et al., 2005).

Е3-лигазы на основе *CUL4* выполняют важные функции на уровне хроматина, включая реакцию на повреждения ДНК, а также принимают участие в сайленсинге гетерохроматина у растений. Исследование лигаз на основе *CUL4* показало, что этот класс убиквитинлигаз играет существенную роль в развитии и размножении растений. Мы обнаружили, что комплекс *CUL4-DDB1* арабидопсиса взаимодействует с *MSI1* (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1) и является необходимым для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*. *MSI1*-подобные белки играют большую роль в функционировании всевозможных белковых комплексов, в том числе и эпигенетического регуляторного репрессивного комплекса Polycomb 2 (*PRC2*). *CUL4* необходим для нормального протекания эмбриогенеза. Потеря функции *CUL4* и *DDB1* приводит к гибели зародышей. Интересно, что, как и у мутантов класса *fis*, у мутантов *cul4* теряется родительское импринтирование экспрессии *MEDEA*, гена-мишени комплекса *PRC2* у арабидопсиса, и обнаруживается автономная инициация эндосперма.

Таким образом, наши исследования предоставили первые доказательства физической и функциональной связи между лигазой CUL4 E3 и комплексом PRC2, что указывает на новую роль убиквитинирования в подавлении экспрессии генов и, прежде всего, генов, связанных с репродукцией (Dumbliauskas et al., 2011).

Объединение генетического, мутационного, протеомного и полнотранскриптомного анализа позволило нам обнаружить роль экзосомы, основная функция ее состоит в регуляции качества РНК, которую она играет в контроле развития женского гаметофита и зародыша, а также факт, что нарушение функции экзосом способствует возникновению эмбриолетального фенотипа и аномалий развития растений. Интересной находкой было обнаружение субфункционализации различных субъединиц протеасомы. Так, субъединица RRP41 необходима для нормального развития зародышевого мешка, RRP4 нужна для полноценного эмбриогенеза, а субъединица CSL4 незаменима для роста и развития растения. Кроме того, полногеномный анализ мозаичных микрочипов позволил нам выявить большое количество новых, неизвестных ранее, субстратов экзосом, в том числе некодирующих РНК, которые связаны с гетерохроматическими областями, также влияющими на репродукцию и развитие растений (таб. 17–20), а также широкое распространение полиаденилирования, ассоциированного с контролем качества РНК у растений, которое выполняет экзосома.

Большое внимание наши исследования уделили генетике апомиксиса, поиску генов, влияющих на апомиксис и их анализу, а также сборке половых и апомиктических геномов *de novo*, их аннотации и сравнительному анализу. Основными объектами наших исследований апомиксиса были растения из рода *Boechera*, включающего в себя как диплоидные половые, так и триплоидные и аллодиплоидные апомиктические виды (Осадчий и др., 2017; Brukhin et al., 2019). Анализ наших и литературных данных позволил выявить несколько десятков генов и мутаций, влияющих на различные компоненты апомиксиса (Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019). Особый интерес представляют исследованные нами гены *APOLLO* и *CENH3*, динамика экспрессии которых заметно отличается в

репродуктивных структурах у половых и апомиктических видов *Boechea* (Bakin et al., 2022). *APOLLO* является наиболее заметным геном, ассоциированным с апомиксисом у растений *Boechea*, интересно и то, что этот ген представлен несколькими половыми и апомиктическими аллелями (Corral et al., 2013; Kliver et al., 2018; Bakin et al., 2022), причем все апомикты гетерозиготны по апо- и половым аллелям, тогда как половые виды содержат лишь половые аллели *APOLLO*. Мы получили любопытные результаты молекулярного филогенетического анализа этого гена, оказалось, что *APOLLO* возник раньше семейства Brassicaceae и его эволюция сопровождалась несколькими дупликациями и разделением на половые и апо- аллели уже после возникновения рода *Boechea*, причем апо-аллели находятся под положительным эволюционным отбором, что характерно для паралогов, приобретающих новую функцию.

При секвенировании большинства растительных геномов, сборка последовательности ридов требует гораздо больших усилий, чем само секвенирование. Первым и единственным опубликованным до недавнего времени геномом *Boechea* был геном полового вида *B. stricta* (Lee et al., 2017). Мы собрали и проаннотировали второй геном половой *B. retrofracta* с использованием коротких ридов Illumina и Roche из одной библиотеки ридов с парными концами и 3-х библиотек с парными ридами (Kliver et al., 2018). Сложные геномы растений остаются особенно трудными для сборки de novo. Это касается и апомиктических видов *Boechea*, которые демонстрируют очень высокий уровень гетерозиготности, что является результатом комбинации разнородных геномов как следствие их гибридного происхождения (Beck et al., 2011; Brukhin et al., 2019). По этим причинам, в результате секвенирования и сборки генома растений de novo может получиться сильно фрагментированная сборка. Геномные последовательности не всегда могут быть корректными, учитывая, что почти идентичные семейства генов, а также длинные повторы довольно трудно собрать. Ключевой задачей является сборка смежных последовательностей (контигов), построенных из коротких последовательностей ридов, в близкие по масштабу к хромосомам скаффолды; а также распределение генетических вариантов в соответствующие гомологичные

хромосомы, процесс, известный как гаплотипирование. Использование данных секвенирования в виде длинных ридов, полученных с помощью технологий Oxford Nanopores (ONT) и Pacific Bioscience (PacBio), а также данных по взаимодействию хроматина на основе технологий улавливания конформации хроматина, таких как (Hi-C), для сборки полной последовательности генома из коротких ридов без использования референсного генома или физической карты в качестве шаблона (Korbel, Lee, 2013; Burton et al., 2013; Xie et al., 2015; Kliver et al., 2018; Brukhin et al., 2019), конвейера Bionano Genomics и данных оптического картирования (Smetanin et al, не опубликовано) с корректировкой сборки методами цитогенетики посредством окрашивания хромосом и использованием GISH (Mandáková et al., 2015) позволило нам впервые собрать высоко гетерозиготный геном апомиктического гибрида *Boechea* до уровня хромосом.

Проведенный нами анализ собранных геномов *Boechea* и отсекуенных, но несобранных геномов, находящихся в открытом доступе в виде библиотек ридов, позволил нам подтвердить, что геномы всех апомиктических видов отличаются высокой гетерозиготностью по сравнению с геномами половых видов (рис. 77–79). Кроме того, исследование сиквенсов апомиктов с помощью k-мер анализа позволило обнаружить "апомиктические" k-меры, которые перекрывались с генами, по-видимому, связанными с наличием апомиктического способа воспроизводства.

Ну и наконец, эпигенетические модификации играют значимую регуляторную роль при мейозе, развитии гаметофитов и эмбриогенезе. Поскольку при апомиксисе отсутствует мейоз и, соответственно, не происходит удаления эпигенетических меток в ДНК и гистонах, спектр метилирования ДНК и гистонов в репродуктивных структурах апомиктов отличается от спектра в соответствующих структурах у половых растений (Brukhin, Albertini, 2022).

Таким образом, нами изучен ряд мутаций и генов, связанных с формированием и женских гаметофитов и семени, а также впервые начато изучение апомиксиса с помощью полногеномных технологий. Появление в последнее десятилетие новых генетических и геномных методов исследования, а

также совершенствование качества и удешевление цены полногеномного секвенирования способствует стремительному ускорению секвенирования, сборки и аннотации геномов различных организмов, хотя данных по геномам растений пока значительно меньше, чем полногеномных данных по животным и микроорганизмам, особенно данных по генетике размножения и развития. Результаты нашей работы помогут настоящим и будущим исследованиям в перечисленных областях, о чем уже можно судить и по постоянно возрастающему цитированию наших публикаций.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что гены, ответственные за гаметофитные мутации *Arabidopsis thaliana* часто проявляют плейотропный эффект при задержке развития гаметофита. В соответствии с наблюдаемым фенотипом мутантных линий наиболее часто встречаются классы: митотического, кариогамного, дегенеративного и материнского эффекта остановки развития женского гаметофита. Экспрессия фенотипа у многих мутантов обнаруживает вариабельность.
2. Показано, что гены убиквитин-протеасомного метаболического пути играют большую роль в гаметогенезе и эмбриогенезе у арабидопсиса.
3. Выявлено, что субъединица RPN1 протеасомы 26S выполняет важную функцию в контроле прогрессии клеточного цикла и дифференцировки во время эмбриогенеза. Паралогичные гены *RPN1a* и *RPN1b* являются функционально эквивалентными, но не избыточными в репродуктивном развитии.
4. Обнаружено, что гены куллин-зависимой убиквитинлигазы *CUL3a* и *CUL3b* демонстрируют функциональную избыточность, функциональное нарушение обеих копий гена *CUL3* снижает гаметофитную передачу, которая приводит к гибели зародышей и находится под материнским контролем.
5. Выявлено, что комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*, таким образом, доказана физическая и функциональная связь между лигазой E3 CUL4 и поликомб-репрессивным комплексом (PRC2), что указывает на новую роль убиквитинирования в регуляции экспрессии генов.
6. Показано, что растительная экзосома имеет важное значение для семенного размножения, а отдельные ее субъединицы функционально специализированы – нарушение функции RRP41 останавливает развитие женских гаметофитов, а RRP4 эмбриогенез. Выявлены новые субстраты экзосом, а также обнаружен «глубоко скрытый» слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов, которые сильно подавляются конститутивной активностью экзосом.

Полученные результаты указывают на серьёзные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до сих пор экзосомных комплексов в других системах.

7. Анализ экспрессии гена *APOLLO*, кодирующего экзонуклеазу NEN3, показал, что уровни его транскриптов высоки во время мейоза и апомейоза, причем в апомиктах сильнее экспрессируются апо-аллели, а в половых только половые аллели гена. На филогенетическом дереве *APOLLO* половые и апомиктические виды *Boechnera* сгруппированы в отдельные клады. В процессе эволюции после серии дупликаций одна из копий белка NEN3 предков *Boechnera* приобрела альтер-функцию, приводящую к апомиксису, апо-аллели находятся под положительным отбором.

8. Впервые осуществлено полногеномное секвенирование и выполнена безреференсная сборка генома полового вида *B. retrofracta* и поэтапная безреференсная сборка до уровня хромосом высоко гетерозиготного генома апомиктического гибрида М4В, у которого идентифицированы дополнительные абберрантные хромосомы *Het* и *Del*, несущие локусы генов, связанных с апомиксисом. Аннотация и сравнительный анализ собранных геномов обнаружили, что аллодиплоидные апомикты *Boechnera* представляют собой высоко гетерозиготные гибриды, по сравнению с геномами половых видов, что является результатом комбинации разрозненных геномов вследствие их гибридогенного происхождения. Для ряда генов, фланкирующие повторы определенной длины отличались у половых и апомиктических видов, что предполагает связь этих генов с наличием апомиктического способа воспроизводства.

9. Цитогенетический анализ выявил, что гибрид М4В является апомиктическим анеуплоидом, предковыми видами которого были половые диплоиды *B. stricta* и *B. retrofracta*. Полный ядерный геном гибрида представлен 15 хромосомами, причем 9 хромосом происходят от генома *B. retrofracta*, а 6 от *B. stricta*. Частично общие сигналы гибридизации зондов, соответствующих геномной ДНК *B. retrofracta* и *B. stricta*, вероятно, связаны с гомогенизацией повторяющихся последовательностей и позволяют предположить, что гибрид М4В – довольно старый и имел более сложную эволюционную историю, чем простая гибридизация. Хромосомы *Het* и

Del являются добавочными хромосомами, специфичными для апомиктов рода *Boechea*, они возникли благодаря амплификации перицентромерного хроматина в гомологичной хромосоме *Boel*, центромерному разрыву между блоками Са и D и перицентрической инверсии блока Са.

Список сокращений

ДПП – день после опыления

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

миРНК – малые интерферирующие РНК

мисРНК – микросателлитоподобные РНК

нкРНК – некодирующая РНК

мяРНК – малые ядерные РНК

мякРНК – малые ядрышковые РНК

прай-миРНК – первичная микроРНК (англ. pri-miRNA)

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (англ. RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная РНК

рДНК – рибосомальная ДНК

РНКи – РНК интерференция

А – абортированные семена

Ac – (англ. *Activator*) транспозон, источник транспозазы

АСК – Ancestral Crucifer Karyotype

18S РНК – субъединица, часть рибосомной РНК, с константой седиментации 18 единиц Сведберга

APOLLO – *APOm*ixis *L*inked *L*ocus

ВАС – Bacterial Artificial Chromosome – искусственная бактериальная хромосома

ВТВ – англ. Bric a brac, Tramtrack, and Broad Complex

ССР – comparative chromosome painting

CENH3 – ген *Centromere Specific Histone 3* – гистон H3-подобный центромерный белок

ChIP – иммунопреципитация хроматина (англ. chromatin immunoprecipitation)

CNV – Copy Number Variation - вариация числа копий генов

Col-0 – *Arabidopsis thaliana*, экотип Columbia

CUL – куллин-зависимые убиквитинлигазы

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, флуоресцентный краситель

DCAFs – DDB1 and CUL4-Associated Factors, содержат мотивы WDxR, необходимые для эффективного связывания DDB

DDB1 – специфический ДНК-связывающий белок при повреждении (англ. damage specific DNA binding protein)

DMR – англ. Differentially Methylated Regions – дифференциально метилированные области

Ds – (англ. *Dissociation*) GT транспозон

ETS – внешний транскрибируемый спейсер (англ. External Transcribed Spacer)

FG1 — одноядерный женский гаметофит

FG2-F3 — двудерный женский гаметофит

FG4 — четырехъядерный женский гаметофит с неслившимися полярными ядрами

FG6 — семиклеточный женский гаметофит со слившимися полярными ядрами

FG7 — четырехклеточный женский гаметофит: антиподальные клетки дегенерировали

FG8 — трехклеточный женский гаметофит: одна из синергидных клеток дегенерирует, а зрелый женский гаметофит состоит из яйцеклетки, центральной клетки и одной персистирующей клетки синергиды

FIE — эндосперм, независимый от оплодотворения (англ. Fertilization Independent Endosperm)

FIS2 — семя, независимое от оплодотворения (англ. Fertilization Independent Seed 2)

FCSS – скрининг семян методом проточной цитометрии (англ. Flow Cytometry Seed Screening)

G1 – первая из трёх фаз клеточного цикла, стадия интерфазы

GFP – зеленый флуоресцентный белок (англ. Green Fluorescent Protein)

GISH – Genome In Situ Hybridization

GT – (англ. Gene Trap) генная ловушка

GUS – репортерный ген β -глюкуронидазы

H3K27me3 – эпигенетическая модификация белка ДНК гистона H3, метка, указывающая на триметилирование лизина 27 гистона H3

Hi-C – высокопроизводительный геномный и эпигеномный метод для захвата конформации хроматина

IAAH – ген *индолацетамидгидролазы*

IGS – межгенный спейсер (англ. The InterGenic Spacer)

ITS – внутренний транскрибируемый спейсер (англ. Internal Transcribed Spacer)

иРНКи – эстрадиол-индуцируемая РНКи (англ. iRNAi – estradiol-inducible RNAi)

Kan^s – устойчивый к канамицину

Kan^r – чувствительный к канамицину

LAM – лазерная микродиссекция (англ. Laser Assisted Microdissection)

LTR – Long terminal repeat – длинные терминальные повторы

MEI1 – мейотический белок 1 образования двухцепочечного разрыва (англ. Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1)

MMC – (англ. Megaspore Mother Cell) материнская клетка мегаспор

MSI1 – подавитель мультикопий IRA1 (англ. Multicopy Suppressor of IRA1)

MS – среда Мурашиге-Скуга

MS/MS – тандемная масс спектрометрия

NAM – альфа-нафталинацетамид

NPC – кластеризация пор ядра

NPTII – ген *неомицинофосфотрансферазы*

PMC – англ. Pollen Mother Cell – материнские клетки пыльцы (микроспороциты)

PRC2 – поликомб репрессивный комплекс 2 (англ. Polycomb Repressive Complex 2)

RACE – быстрая амплификация концов кДНК (англ. Rapid Amplification of cDNA Ends)

RBX1 – белок RING бокс 1

RdDM – РНК-зависимое метилирование ДНК (англ. RNA-directed DNA methylation)

RISC – РНК-индуцированный комплекс молчания (англ. RNA-induced silencing complex)

RPN1 – регуляторная субъединица1 протеасомы

S – фаза клеточного цикла, стадия интерфазы, в которой происходит репликация ДНК

SAM – Shoot Apical Meristem – апикальная меристема побега

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (англ. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)

SKP1 – Белок, ассоциированный с киназой S-фазы (англ. S-phase kinase associated protein)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (англ. Single Nucleotide Polymorphysm)

TAP – тандемная аффинная очистка (англ. Tandem Affinity Purification)

TE – эффективность передачи признака (англ. Transmission Efficiency)

TRAMP комплекс - комплекс полиаденилирования Trf4/Air2/Mtr4p, мультипротеиновый гетеротримерный комплекс, обладающий активностью распределительного полиаденилирования и идентифицирующий широкий спектр РНК, продуцируемых полимеразами

Ub – убиквитин

UO – (англ. unfertilized ovules) неоплодотворенные семязачатки

UPGRADE2 – ген *Unreduced Pollen GRain Development2*

5' и 3' UTR – 3' и 5' нетранслируемые области (англ. UnTranslated Regions)

YFP – желтый флуоресцентный белок (англ. Yellow Fluorescent Protein)

WGS – полногеномное секвенирование (Whole Genome Sequencing)

Ws – *Arabidopsis thaliana*, экотип Wassilewskija

WT – контрольные растения дикого типа (англ. Wild type)

Список литературы

1. Батыгина, Т.Б. Генетическая гетерогенность семян: эмбриологические аспекты/ Т.Б. Батыгина // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 3. – С. 438–454.
2. Батыгина, Т.Б. Размножение растений/ Т.Б. Батыгина, В.Е. Васильева. – СПб: Изд-во СПбГУ, 2002. – 232 с.
3. Батыгина, Т.Б. Эмбриогенез пионовых / Т.Б. Батыгина, В.Б. Брюхин. – Т. 2. – Эмбриология цветковых растений. – ред. Т.Б. Батыгина. – Санкт-Петербург: Изд. Мир и Семья, 1997. – с. 539–544.
4. Брюхин, В.Б. Развитие зародыша пиона *in vitro*: Автореф. дис. канд. Биол. наук: 03.00.05 / Брюхин Владимир Борисович // Санкт-Петербург, 1993. – 21 с.
5. Брюхин, В.Б. Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса / В.Б. Брюхин // Генетика. – 2017. – Т. 53. – №9. – С. 1001–1024. – doi: 10.1134/S1022795417090046.
6. Брюхин, В.Б. Функциональная генетика и геномика / В.Б. Брюхин, Е.В. Андрусенко. – Санкт-Петербург: Изд. Университета ИТМО. – 2021. – 113 с. – <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2759.pdf>
7. Карпеченко, Г.Д. (1935). Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия. Теоретические основы селекции растений / Г.Д. Карпеченко. – Москва: Кинопечать. – Т. 1. – Общая селекция растений, 1935. – С. 398–434.
8. Кашин, А.С. Апомиксис в эволюции цветковых растений: онто- и филогенетические аспекты проблемы / Изд. Саратовского университета, 1993. – 193 с.
9. Герасимова-Навашина, Е.Н. Оплодотворение как онтогенетический процесс / Е.Н. Герасимова-Навашина // Бот. Журнал СССР. – 1957. – Т. 42. – С. 1654–1673.

10. Герасимова-Навашина, Е.Н. Двойное оплодотворение покрытосеменных и некоторые его теоретические аспекты / Е.Н. Герасимова-Навашина. – Сборник "Проблемы эмбриологии". – Киев: Наук. Думка, 1971. – С. 113–152.
11. Модилевский, Я.С. Апомиксис у покрытонасінных рослин / Я.С. Модилевский // Бот. журн. АН УССР. – 1948. – Т. 5. – № 2. – С. 5–21.
12. Навашин, М. С. Новая возможность в селекции / М.С. Навашин // Селекция и семеноводство. – 1933. - № 2, 11–16.
13. Осадчий, Я.В. Апомиксис в роде *Boechea* (Brassicaceae) текущее состояние проблемы / Я.В. Осадчий, Т.Н. Наумова, В.Б. Брюхин // Ботанический журнал. – 2017. – Т. 102. - № 12. – С. 1587–1607.
14. Петров, Д.Ф. Генетически регулируемый апомиксис / Д.Ф. Петров. – Изд. Новосибирск: СО АН СССР. – 1964. – С. 188.
15. Петров, Д.Ф. Потомство без отцов (апомиксис и его значение для селекции) / Д.Ф. Петров. – Новосибирск: Изд. Наука. – 1976. – 125 с.
16. Петров, Д.Ф. Апомиксис в природе и опыте / Д.Ф. Петров. – Новосибирск: Изд. Наука. – 1988. – 216 с.
17. Полякова, Т. Ф. Развитие мужского и женского гаметофитов *Arabidopsis thaliana* (L) Heunh / Т.Ф. Полякова // Исследов. Генет. СССР. – 1964. – Т. 2. – С. 125–133.
18. Поддубная-Арнольди, В. А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений / В.А. Поддубная-Арнольди. – М: Наука. – 1976. – 486 с.
19. Соколов, В.А. Существует ли гаметофитный апомиксис у диплоидных цветковых растений? // В.А. Соколов, П.А. Панихин, Т.К. Тараканова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – С. 80–101.
20. Соколов, В.А. О возможности экспериментальной модификации импринтинга у апомиксичных растений / В.А. Соколов, Э.А. Абдырахманова // Генетика. – 2019 – Т. 55.- №8. С.887-892. doi: 10.1134/S0016675819080149
21. Солнцева, М.П. Основы эмбриологической классификации апомиксиса покрытосеменных/ М.П. Солнцева //Апомиксис и селекция. – М. – 1970. С. 87–100.

22. Солнцева, М.П. Эмбриологические основы апомиксиса покрытосеменных / Маргарита Петровна Солнцева // Автореф. дисс. докт. биол. наук: 03.00.05. – Кишинев Бот Сад, Акад. наук Молд. ССР. – 1988. – 48 С.
23. Хохлов, С.С. Бесполосеменные растения / С.С. Хохлов // Учён. зап. Сарат. ун-та. – 1946. – Т. 16. – Вып. 1. – С. 3–74.
24. Хохлов, С.С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений / С.С. Хохлов // Успехи современной генетики. – М. – 1967. – Вып.1. – С. 43–105.
25. Хохлов, С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений / С.С. Хохлов // Апомиксис и селекция. – М. – 1970. – С. 7–21.
26. Шамров, И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение / И.И. Шамров. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 350 с.
27. Яковлев, М.С. Сравнительная эмбриология цветковых растений / М.С. Яковлев. – Отв. ред. М.С.Яковлев. – Л.: Наука. – 1981. – 264 С.
28. Abbas, T. PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex / T. Abbas, U. Sivaprasad, K. Terai, V. Amador, M. Pagano, A. Dutta // *Genes Dev.* – 2008. – V. 22. – P. 2496–2506.
29. Akama, S. Genome-wide quantification of homeolog expression ratio revealed nonstochastic gene regulation in synthetic allopolyploid *Arabidopsis* / S. Akama, R. Shimizu-Inatsugi, K. Shimizu, J. Sese // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – 42:e46. doi: 10.1093/nar/gkt1376
30. Albertini, E. Did apomixis evolve from sex or was it the other way around? / E. Albertini, G. Barcaccia, J.G. Carman, F. Pupilli // *J Exp Bot.* – 2019. – 70(11). – P. 2951-2964. doi: 10.1093/jxb/erz109.
31. Alexander, P. J. Molecular phylogenetics and taxonomy of the genus *Boechera* and related genera (Brassicaceae: Boechereae) / P. J. Alexander, M. D. Windham, J. B. Beck, I. A. Al-Shehbaz, L. Allphin, C. D. Bailey // *Syst. Bot.* – 2013. – V. 38. – P. 192–209. doi: 10.1600/036364413X661917

32. Aliyu, O. Copy number variation in transcriptionally active regions of sexual and apomictic *Boecheera* demonstrates independently derived apomictic lineages // O. Aliyu, M. Seifert, J. Corral, J. Fuchs, T. Sharbel // *Plant Cell*. – 2013. – V. 25. – P. 3808–3823. doi: 10.1105/tpc.113.113860
33. Aliyu, O. M. Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boecheera* (Brassicaceae) / O. M. Aliyu, M. E. Schranz, T. F. Sharbel // *Am. J. Bot.* – 2010. – V. 97. – P. 1719–1731. doi: 10.3732/ajb.10001888
34. Allen, S.C. Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein / S.C. Allen, C.M. Barrett, N. Ray, C. Robinson // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 10362- 10366.
35. Allmang, C. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis / C. Allmang, J. Kufel, G. Chanfreau, P. Mitchell, E. Petfalski, D. Tollervey // *EMBO J.* – 1999a. – V. 18. P. 5399–5410.
36. Allmang, C. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 30–> 50 exonucleases // C. Allmang, E. Petfalski, A. Podtelejnikov, M. Mann, D. Tollervey, P. Mitchell // *Genes Dev.* – 1999b. – V.13. – P. 2148–2158.
37. Allmang, C. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome / C. Allmang, P. Mitchell, E. Petfalski, D. Tollervey // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 1684–1691.
38. Alonso, J.M., et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* / J.M. Alonso, et al. // *Science*. – 2003. – V. 301. – P. 653–657.
39. Al-Shehbaz, I. A. Transfer of most North American species of *Arabis* to *Boecheera* (Brassicaceae) / I.A. Al-Shehbaz // *Novon*. – 2003. – V. 13. – P. 381–391. doi: 10.2307/3393366
40. Al-Shehbaz, I. A. Nomenclatural notes on Eurasian *Arabis* (Brassicaceae) / I.A. Al-Shehbaz // *Novon*. – 2005. -. V 15. – P. 519–524.
41. Al-Shehbaz, I. A. Proposal to conserve the name *Boecheera* against *Borodinia* (Cruciferae) / I. A. Al-Shehbaz, D. A. German // *Taxon*. – 2010. – V. 59. – P. 648–649. doi: 10.1002/tax.592037

42. Altpeter, F. Advancing crop transformation in the era of genome editing / F., Altpeter, N. Springer, L. Bartley, A. Blechl, T. Brutnell, V. Citovsky, et al. // *Plant Cell*. – 2016. – V. 28. – P. 1510–1520. doi: 10.1105/tpc.16.00196
43. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // *J Mol Biol*. – 1990. – V. 215. – P. 403–410.
44. Altschul, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic Acids Res*. – 1997. – V. 25. – P. 3389–3402.
45. Ambawat, S. MYB Transcription Factor Genes as Regulators for Plant Responses: An Overview / S. Ambawat, P. Sharma, N.R. Yadav, R.C. Yadav // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. – 2013. – V. 19. – P. 307–321.
46. Amiteye, S. Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechnera* species / S. Amiteye, J. M. Corral, H. Vogel, T. F. Sharbel // *BMC Genomics*. – 2011. – V. 12. P. 500. doi: 10.1186/1471-2164-12-500
47. Amiteye, S. Novel microRNAs and microsatellite-like small RNAs in sexual and apomictic *Boechnera* species / S. Amiteye, J. M. Corral, H. Vogel, M. Kuhlmann, M. F. Mette, T. F. Sharbel // *MicroRNA*. – 2013. – V. 2. – P. 45–62. doi: 10.2174/2211536611302010006
48. Anderson, J.T. Life history QTLs and natural selection on flowering time in *Boechnera stricta*, a perennial relative of *Arabidopsis* / J.T. Anderson, C.-R. Lee, T. Mitchell-Olds // *Evolution*. – 2011a. – V. 65. – P. 771–787. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01175.x
49. Anderson, J.T. Evolutionary genetics of plant adaptation / J.T. Anderson, J.H. Willis, T. Mitchell-Olds // *Trends Genetics*. – 2011b. – V. 27. P. 258-266. DOI: 10.1016/j.tig.2011.04.001
50. Angers, S. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery / S. Angers, T. Li, X. Yi, M.J. MacCoss, R.T. Moon, N. Zheng // *Nature*. – 2006. – V. 443. – P. 590–593.

51. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* / Arabidopsis Genome Initiative // Nature. – 2000. – V. 408. – P. 796–815.
52. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // J.Mol. Biol. – 1990. – V. 215. – P. 403-410. – DOI: 10.1006/jmbi.1990.9999
53. Asker, S.E. *Apomixis in Plants* / S.E. Asker, L. Jerling // Boca Raton, FL: CRC Press. – 1992. – 314 P.
54. Bai, C. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box / C. Bai, P. Sen, K. Hofmann, L. Ma, M. Goebel, J.W. Harper, S.J. Elledge // Cell. – 1996. – V. 86. – P. 263–274.
55. Aslam, M. Big Role of Small RNAs in Female Gametophyte Development / M. Aslam, B. Fakher, Y. Qin // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23(4). – P. 1979. – doi: 10.3390/ijms23041979.
56. Bailly, E. Functional characterization of Rpn3 uncovers a distinct 19S proteasomal subunit requirement for ubiquitin-dependent proteolysis of cell cycle regulatory proteins in budding yeast / E. Bailly, S.U. Reed // Mol. Cell. Biol. – 1999. – V. 19. – P. 6872–6890.
57. Baker, R.E. Mutations synthetically lethal with *cep1* target *S. cerevisiae* kinetochore components / R.E. Baker, K. Harris, K. Zhang // Genetics. – 1998. – V. 149. – P. 73–85.
58. Bakin, E. Phylogenetic and expression analysis of *CENH3* and *APOLLO* genes in sexual and apomictic *Boechera* species / E. Bakin, F. Sezer, A. Özbilen, I. Kilic, B. Uner, M. Rayko, K.M. Taskin, V. Brukhin // Plants (MDPI). – 2022. – V. 11(3). – P. 387. – doi: [10.3390/plants11030387](https://doi.org/10.3390/plants11030387).
59. Balloux, F. The estimation of population differentiation with microsatellite markers / F. Balloux, N. Lugon-Moulin // Mol. Ecol. – 2002. – V. 11. – P. 155–165. – doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x

60. Bao, W. Repbase Update a database of repetitive elements in eukaryotic genomes / W. Bao, K. K. Kojima, O. Kohany // *Mobile DNA*. – 2015. – V. 6 (1). – P. 11. – DOI: 10.1186/s13100-015-0041-9.
61. Barcaccia, G. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma / G. Barcaccia, E. Albertini // *Plant Reprod.* – 2013. – V. 26. – P. 159–179. – doi: 10.1007/s00497-013-0222-y.
62. Bard, J.A.M. Structure and Function of the 26S Proteasome / J.A.M. Bard, E.A. Goodall, E.R. Greene, E. Jonsson, K.C. Dong, A. Martin // *Ann Rev Biochem.* – 2018. – V. 20(87). – P. 697-724. – doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011931.
63. Barneche, F. Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana* / F. Barneche, F. Steinmetz, M. Echeverria // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 27212–27222.
64. Baroux, C. Dynamic regulatory interactions of Polycomb group genes: *MEDEA* autoregulation is required for imprinted gene expression in *Arabidopsis* / C. Baroux, V. Gagliardini, D.R. Page, U. Grossniklaus // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – P. 1081–1086.
65. Baroux, C. Non-random chromosome arrangement in triploid endosperm nuclei / C. Baroux, A. Pecinka, J. Fuchs, G. Kreth, I. Schubert, U. Grossniklaus // *Chromosoma*. – 2017. – V. 126(1). – P. 115-124. – doi: 10.1007/s00412-016-0578-5. Epub 2016 Feb 19. PMID: 26892012.
66. Baroux C. Chromatin modification and remodeling during early seed development / C. Baroux, S. Pien, U. Grossniklaus // *Curr Opin Genet Dev.* – 2007. – V. 17(6). – P. 473-9. – doi: 10.1016/j.gde.2007.09.004.
67. Baroux, C. Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants / C. Baroux, C. Spillane, U. Grossniklaus // *Genome Biol.* – 2002. – V. 3. – P. 1026.1–1026.5.
68. Bateman, A. The Pfam protein families database / A. Bateman, L. Coin, R. Durbin, R.D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, et al. // *Nucl. Acids Res.* – 2004 – V. 32. – Suppl_1. – P. 138-141. – DOI: 10.1093/nar/28.1.263

69. Battaglia, E. Apomixis. Recent advances in the embryology of Angiosperms / E. Battaglia // Delhi. - 1963. P. 221-264.
70. Baulcombe, D.C. Epigenetic regulation in plant responses to the environment / D.C. Baulcombe, C. Dean // Cold Spring Harbor Persp. Biol. – 2014. – V. 6(9). – a019471. – doi: 10.1101/cshperspect.a019471.
71. Bayer, E.M. Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology / E. M. Bayer, A. R. Bottrill, J. Walshaw, M. Vigoroux, M. J. Naldrett, C.L. Thomas, A.J. Maule // Plant Proteomics. – 2006. – V. 6. – P. 301-311.
72. Beck, J.B. Does hybridization drive the transition to asexuality in diploid *Boechera*? / J.B. Beck, P.J. Alexander, L. Allphin, I.A. Al-Shehbaz, C. Rushworth, C.D. Bailey, et al. // Evolution. – 2012. – V. 66. – P. 985–995. – doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01507.x.
73. Becker, C. Spontaneous epigenetic variation in the Arabidopsis thaliana methylome / C. Becker, J. Hagmann, J. Müller, D. Koenig, O. Stegle, K. Borgwardt, D. Weigel // Nature. – 2011. – V. 480(7376). – P. 245-9. – doi: 10.1038/nature10555.
74. Beisvag, V. GeneTools – application for functional annotation and statistical hypothesis testing / V. Beisvag, F.K. Junge, H. Bergum, L. Jolsum, S. Lydersen, C.C. Gunther, H. Ramampiaro, M. Langaas, A.K. Sandvik, A. Laegreid // BMC Bioinformatics. – 2006. – V. 7. – P. 470.
75. Bengtsson, B.O. Asex and evolution: a very large-scale overview / B.O. Bengtsson // Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis; eds I. Schön, K. Martens, P. van Dijk. – Berlin. Springer. – 2009. – P. 1–19.
76. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / G. Benson // Nucleic acids research. – 1999. – V. 27(2). – P. 573. – DOI: 10.1093/nar/27.2.573
77. Berleth, T. The role of monopteros gene in organizing the basal body region of the *Arabidopsis* embryo / T. Berleth, G. Jürgens // Development. – 1993. – V. 118. – P. 575-587.

78. Bernhardt, A. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its down-regulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana* / A. Bernhardt, E. Lechner, P. Hano, V. Schade, M. Dieterle, M. Anders, M.J. Dubin, G. Benvenuto, C. Bowler, P. Genschik, H. Hellmann // *Plant J.* – 2006. – V.47. – P. 591–603.
79. Bernal, A.J. (2008). Functional analysis of the cellulose synthase like genes CSLD1, CSLD2 and CSLD4 in tip growing *Arabidopsis* cells / A.J. Bernal, C.M. Yoo, M. Mutwil, J.K. Jensen, G. Hou, C. Blaukopf, I. Sorensen, E.B. Blancaflor, H.V. Scheller, W.G. Willats // *Plant Physiology.* – 2008. – V. 148. – P. 1238-1253.
80. Bicknell, R.A. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums / R.A. Bicknell, A.M. Koltunow // *The Plant Cell.* – 2004. – V. 16(1). – P. 228-245. – doi: 10.1105/tpc.017921
81. Bicknell, R. Seeds of doubt: mendel’s choice of *Hieracium* to study inheritance, a case of right plant, wrong trait / R. Bicknell, A. Catanach, M. Hand, A. Koltunow // *Theor. Appl. Genet.* – 2016. – V. 129. – P. 2253–2266. – doi: 10.1007/s00122-016-2788-x
82. Blanc, G. Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome / G. Blanc, A. Barakat, R. Guyot, R. Cooke, M. Delseny // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 1093–1101.
83. Blanc G. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome / Blanc G., Hokamp K., Wolfe K.H. // *Genome Res.* – 2003. – V. 13. – P. 137–144.
84. Blilou I. The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation / Blilou I., F. Frugier, S. Folmer, O. Serralbo, V. Willemsen et al. // *Genes Dev.* – 2002. – V.16. – P. 2566–2575.
85. Boavida, L.C. A collection of Ds insertional mutants associated with defects in male gametophyte development and function in *Arabidopsis thaliana* / L.C. Boavida, B. Shuai, H.J. Yu, G.C. Pagnussat, V. Sundaresan, S. McCormick // *Genetics* – 2009. – V. 181. – P. 1369-1385.

86. Böcher, T. W. Cytological studies of *Arabis holboellii* / T. W. Böcher // *Hereditas.* – 1947. – V. 32. – P. 573–575.
87. Böcher, T. W. Cytogenetical and embryological studies in the amphiapomictic *Arabis holboellii* complex / T. W. Böcher // *Biol. Skr.* – 1951. – V. 6. – P. 1–58.
88. Böcher, T. W. Experimental taxonomical studies in the *Arabis holboellii* complex / T. W. Böcher // *Sven Bot. Tidskr.* – 1954. – V. 48. – P. 31–44.
89. Böcher, T. W. Further studies in *Arabis holboellii* and allied species / T. W. Böcher // *Bot. Tidsskr.* – 1969. – V. 64. – P. 141–161.
90. Boetzer, M. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE / M. Boetzer, C.V. Henkel, H.J. Jansen, D. Butler, W. Pirovanov // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 27. – P. 578-579. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btq683
91. Bolaños-Villegas, P. Insights Into the Role of Ubiquitination in Meiosis: Fertility, Adaptation and Plant Breeding / P. Bolaños-Villegas, W. Xu, M. Martínez-García, M. Pradillo, Y. Wang // *Arabidop. Book.* – 2018. – V. 16. – P. e0187–e0187. – doi: 10.1199/tab.0187
92. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – P. 2114-2120. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
93. Bonhomme, S. T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in *Arabidopsis* is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone / S. Bonhomme, C. Horlow, D. Vezon, De S., Laissardiere, A. Guyon et al. // *Mol.Gen. Genet.* – 1998. – V. 260. – P. 444–452.
94. Borg, M. Targeted reprogramming of H3K27me3 resets epigenetic memory in plant paternal chromatin / M. Borg, Y. Jacob, D. Susaki, C. LeBlanc, D. Buendía et al. // *Nat Cell Biol.* – 2020. – V. 22(6). – P. 621-629. – doi: 10.1038/s41556-020-0515-y.
95. Bouyer, D. DNA methylation dynamics during early plant life / D. Bouyer, A. Kramdi, M. Kassam, M. Heese, A. Schnittger, F. Roudier, V. Colot // *Genome Biol.* – 2017. – V. 25;18(1). – P.179. – doi: 10.1186/s13059-017-1313-0.

96. Bousquet-Antonelli, C. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover / C. Bousquet-Antonelli, C. Presutti, D. Tollervey // *Cell*. – 2000. – V. 102. – P. 765–775.
97. Bratzel, F. Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination / F. Bratzel, G. López-Torrejón, M. Koch, J.C. Del Pozo, M. Calonje // *Curr Biol*. – 2010. – V. 20. – P. 1853–1859.
98. Bräuning, S. Comparative transcriptome analysis of the wild-type model apomict *Hieracium praealtum* and its loss of parthenogenesis (*lop*) mutant / S. Bräuning, A. Catanach, J.M. Lord, R. Bicknell, R.C. Macknight // *BMC Plant Biol*. – 2018. – V. 18(1). – P. 206. – doi: 10.1186/s12870-018-1423-1.
99. Brink, R. A. Segregation for the waxy character in maize pollen and differential development of the male gametophyte / R. A. Brink, J.H. MacGillivray // *Am. J. Bot.* – 1924. – V. 11. – P. 465-469. – doi.org/10.2307/2435587
100. Brouwer, R. Three novel components of the human exosome / R. Brouwer, C. Allmang, R. Raijmakers, Y. van Aarssen, W.V. Egberts, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 6177–6184.
101. Brukhin, V.B. Histochemical and immunohistochemical aspects of embryogenesis / V.B. Brukhin. – In: *Embryology of flowering plants Terminology and Concepts*. – Ed. Prof. T. Batygina. – USA: Enfield, NH, Science Publisher Inc. – Vol. 2 Seed, 2006. – P. 370-373.
102. Brukhin, V. Epigenetic Control in Plants / V. Brukhin // *Epigenomes*. – 2020. – V. 4(3). – P. 11. – <https://doi.org/10.3390/epigenomes4030011>.
103. Brukhin, V. Epigenetic Modifications in Plant Development and Reproduction / V. Brukhin, E. Albertini // *Epigenomes*. – 2021. – V. 5(4). – P. 1-14. – doi: 10.3390/epigenomes5040025.
104. Brukhin, V. A brief note on genes that trigger components of apomixis / V. Brukhin, R. Baskar // *Journal of Biosciences*. – 2019. – V. 44(2):45. – DOI: 10.1007/s12038-019-9850-1.

105. Brukhin, V.B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala* L / V.B. Brukhin, T.B. Batygina // *Phytomorphology*. – 1994. – V. 44. – № 3-4. – P. 151-157.
106. Brukhin, V.B. Proliferative activity of callus culture of *Taxus baccata* in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis / V.B. Brukhin, I.R. Moleva, L.H. Filonova, V.P. Grakhov, Ya.B. Blume, P.V. Bozhkov // *Biotechnology Letters* (Chapman & Hall, London). – 1996. – V. 18(11). – P. 1309-1314.
107. Brukhin, V.B. Female gametophyte development and embryogenesis in *Taxus baccata* L. / V.B. Brukhin, P.V. Bozhkov // *Acta Soc. Bot. Pol.* – 1996. – V. 65. – № 1–2. – P. 135–139.
108. Brukhin, V. Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce / V. Brukhin, D. Clapham, M. Elfstrand, S. von Arnold // *Plant Cell Reports*. – 2000. – V. 19. – P. 899-903.
109. Brukhin, V. The angiosperm female gametophyte no longer forgotten generation / Brukhin V., Curtis M.D., Grossniklaus U. // *Current Science*. – 2005a. – 89 (11). – P. 1844-1852.
110. Brukhin, V. The RPN1 subunit of the 26S proteasome in *Arabidopsis* is essential for embryogenesis / V. Brukhin, J. Gheyeselink, V. Gagliardini, P. Genschik, U. Grossniklaus // *The Plant Cell*. – 2005b. – V. 17 (10). – P. 2723-37.
111. Brukhin, V. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry / V. Brukhin, M. Hernould, N. Gonzalez, C. Chevalier, A. Mouras // *Sex. Plant Reproduction*. – 2003. – V. 15 (6). – P. 311-320.
112. Brukhin, V. Female Gametophytic Mutants of *Arabidopsis thaliana* Identified in a Gene Trap Insertional Mutagenesis Screen / V. Brukhin, M. Jaciubek, A. Bolanos Carpio, V. Kuzmina, U. Grossniklaus // *Int. J. Dev. Biol.* – 2011. – V.55. – P. 73-84.
113. Brukhin, V. Plant growth and development - basic knowledge and current views / V. Brukhin, N. Morozova // *Mathematical Modelling Natural Phenomena*. – 2011. V. 6. – № 2. – P. 1- 53.

114. Brukhin, V. The *Boecheera* Genus as a Resource for Apomixis Research / V. Brukhin, J.V. Osadtchiy, A. M. Florez-Rueda, D. Smetanin, M.S. Nobre, E. Bakin, U. Grossniklaus // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – V. 10:392. – P. 1-19. – doi: 10.3389/fpls.2019.00392.
115. Büche, C. *eid1*: a new *Arabidopsis* mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses / C. Büche, C. Poppe, E. Schäfer, T. Kretsch // *Plant Cell*. – 2000. – V. 12. – P. 547–558.
116. Bühler, M. RNAi-dependent and -independent RNA turnover mechanisms contribute to heterochromatic gene silencing / M. Bühler, W. Haas, S.P. Gygi, D. Moazed // *Cell*. – 2007. – V. 129. – P. 707–721.
117. Buchwald G., Structure and E3-ligase activity of the ring-ring complex of Polycomb proteins Bmi1 and Ring1b / G. Buchwald, P. van der Stoop, O. Weichenrieder, A. Perrakis, M. van Lohuizen, T.K. Sixma // *EMBO J*. – 2006. – V. 25. – P. 2465–2474.
118. Budziszewski, G.J. *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning / G.J. Budziszewski, S.P. Lewis, L.W. Glover, J. Reineke, G. Jones et al. // *Genetics*. – 2001. – V. 159. – P. 1765-1778.
119. Burgess, M.B. Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in *Amelanchier* (Rosaceae) / M.B. Burgess, K.R. Cushman, E.T. Doucette, N. Talent, C.T. Frye, C.S. Campbell // *Am J Bot*. 2014. – V. 101(8). – P.1375-87. – doi: 10.3732/ajb.1400113.
120. Burk, D.H. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation / D.H. Burk, B. Liu, R. Zhong, W.H. Morrison, Z.H. Ye // *Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 807–827.
121. Burton, J.N. Chromosome-scale scaffolding of de novo genome assemblies based on chromatin interactions / Burton J.N., Adey A., Patwardhan R.P., Qiu R., Kitzman J.O., Shendure J. // *Nat Biotechnol*. – 2013. – V. 31(12). – P. 1119-25. - doi: 10.1038/nbt.2727.

122. Buschmann, H. Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion / H. Buschmann, J. Chan, L. Sanchez-Pulido, M.A. Andrade-Navarro, J.H. Doonan, C.W. Lloyd // *Curr. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 1938-1943.
123. Caggiano, M. P. Live Imaging of Arabidopsis Leaf and Vegetative Meristem Development / M. P. Caggiano, X. Yu, C. Ohno, P. Sappl, M. G. Heisler // *Methods Mol Biol.* – 2021. – V. 2200. – P. 295-302. – doi: 10.1007/978-1-0716-0880-7_13.
124. Calarco, J.P. Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA / J.P. Calarco, F. Borges, M.T. Donoghue, F. Van Ex, P.E. Jullien et al. // *Cell.* – 2012. – V. 151(1). – P. 194-205. – doi: 10.1016/j.cell.2012.09.001.
125. Calderini, O. Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice / O. Calderini, S. B. Chang, H. de Jong, A. Busti, F. Paolocci et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – V. 112. – P. 1179–1191. – doi: 10.1007/s00122-006-0220-7
126. Cano, L. Major transcriptome reprogramming underlies floral mimicry induced by the rust fungus *Puccinia monoica* in *Boechera stricta* / L. Cano, S. Raffaele, R. Haugen, D. Saunders, L. Leonelli, D. MacLean et al. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8:e75293. – doi: 10.1371/journal.pone.0075293
127. Cao, X. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation / X. Cao, W. Aufsatz, D. Zilberman, M.F. Mette, M.S. Huang, M. Matzke, S.E. Jacobsen // *Curr. Biol.* – 2003. – V. 13. – P. 2212–2217.
128. Capron, A. The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: Molecular and genetic characterization of the APC2 subunit / A. Capron, O. Serralbo, K. Fulop, F. Frugier, Y. Parmentier et al. // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15. – P. 2370–2382.

129. Capron, A. Embryogenesis: pattern formation from a single cell / A. Capron, S. Chatfield, N. Provart, T. Berleth // *Arabidopsis Book*. – 2009. – V. 7:e0126. – doi: 10.1199/tab.0126.
130. Carballo, J. Differential Methylation Patterns in Apomictic vs. Sexual Genotypes of the Diplosporous Grass *Eragrostis curvula* / J. Carballo, D. Zappacosta, G. Marconi, Gallardo J., Di Marsico M., Gallo C.A., Caccamo M., E. Albertini, V. Echenique // *Plants (Basel)*. – 2021. – V.10(5). – P. 946. doi: 10.3390/plants10050946.
131. Carman, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony / J. G. Carman // *Biol. J. Linnean Soc.* – 1997. – V. 61. – P. 51–94. – doi: 10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x.
132. Carman, J. G. Do duplicate genes cause apomixis? / J. G. Carman. - in “Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives”, eds E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. J. van Dijk, and T. F. Sharbel. – Rugell: A. R. G. Gantner Verlag, 2007. – P. 63–91.
133. Carman, J. G. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australian *Elymus* species / J. G. Carman, C. Crane, O. Riera Lizarazu // *Crop. Sci.* – 1991 – V. 31. – P. 1527–1532. – doi: 10.2135/cropsci1991.0011183X003100060029x
134. Carman, J.G. Apospory appears to accelerate onset of meiosis and sexual embryo sac formation in sorghum ovules / J.G. Carman, M. Jamison, E. Elliott, K.K. Dwivedi, T.N. Naumova // *BMC Plant Biol.* – 2011. – V. 11:9. – P. 1-13. – doi: 10.1186/1471-2229-11-9.
135. Carman, J.G. Apospory and Diplospory in Diploid *Boechera* (Brassicaceae) May Facilitate Speciation by Recombination-Driven Apomixis-to-Sex Reversals / J.G. Carman, M. Mateo de Arias, L. Gao, X. Zhao, B.M. Kowallis, et al. // *Front Plant Sci.* – 2019. – V. 10:724. – doi: 10.3389/fpls.2019.00724.
136. Catanach, A.S. Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium* / A.S. Catanach, S.K. Erasmuson, E. Podivinsky, B.R.

- Jordan, R. Bicknell // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 2006. – V. 103. – P. 18 650–18 655.
137. Cave, M. S. Embryogeny in the California peonies with reference to their taxonomic position / M. S. Cave, H. J. Arnott, S. A. Cook // Am. J. Bot. – 1961. – V. 48. – P. 397-404.
138. Charlesworth, B. Mutation-selection balance and the evolutionary advantage of sex and recombination / B. Charlesworth // Genet. Res. – 2008. – V. 89. – P. 451–473. – doi: 10.1017/S0016672308009658
139. Charlesworth, B. Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by muller’s ratchet / B. Charlesworth, D. Charlesworth // Genet. Res. – 1997. – V. 70. – P. 63–73. – doi: 10.1017/S0016672397002899.
140. Charlesworth, D. Breeding systems and genome evolution / D. Charlesworth, S. Wright // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2001. – V. 11. – P. 685–690. – doi: 10.1016/S0959-437X(00)00254-9.
141. Chaudhury, A.M. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* / A.M. Chaudhury, L. Ming, C. Miller, S. Craig, E.S. Dennis, W.J. Peacock // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – V. 94. – P. 4223–4228.
142. Chekanova, J.A. Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells / J.A. Chekanova, R.J. Shaw, M.A. Wills, D.A. Belostotsky // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 33158–33166.
143. Chekanova, J.A. *Arabidopsis thaliana* exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 30/50 exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains / J.A. Chekanova, J.A. Dutko, I.S. Mian, D.A. Belostotsky // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – P. 695–700. – doi: 10.1093/nar/30.3.695.
144. Chekanova, J.A. Genome-Wide High-Resolution Mapping of Exosome Substrates Reveals Hidden Features in the *Arabidopsis* Transcriptome / J.A. Chekanova, B.D. Gregory, S.V. Reverdatto, H. Chen, R. Kumar, T. Hooker, J. Junshi Yazaki, P. Li, N. Skiba, Q. Peng, J. Alonso, V. Brukhin, U. Grossniklaus,

- J.R. Ecker, D.A. Belostotsky // *Cell*. – 2007. – V. 131 (7). – P. 1340-1353. – doi: 10.1016/j.cell.2007.10.056.
145. Chen, J.G. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis / J.G. Chen, H. Ullah, J.C. Young, M.R. Sussman, A.M. Jones // *Genes Dev.* – 2001a – V. 15. – P. 902–911.
146. Chen, C.Y. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs / C.Y. Chen, R. Gherzi, S.E. Ong, E.L. Chan, R. Raijmakers, et al. // *Cell*. – 2001b. – V. 107. – P. 451–464.
147. Chen, Z. (2008). Chromatin Assembly Factor1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana* / Z. Chen, J.L. Tan, M. Ingouff, V. Sundaresan, F. Berger // *Development*. – 2008. – V. 135. – P. 65–73.
148. Cheong, W.H. ClicO FS: an interactive web-based service of Circos / W.H. Cheong, Y.C. Tan, S.J. Yap, K.P. Ng // *Bioinformatics*. – 2015. – V. 31(22). – P. 3685-7. – doi: 10.1093/bioinformatics/btv433.
149. Chin, C.-S. Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing / C.-S. Chin, P. Peluso, F. J. Sedlazeck, M. Nattestad, G. T. Concepcion, A. Clum et al. // *Nat. Methods*. – 2016. – V. 13. – P. 1050–1054. – doi: 10.1038/nmeth.4035
150. Christensen, C. A. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant / C. A. Christensen, E. J. King, J. R. Jordan, G. N. Drews // *Sex. Plant Reprod.* – 1997. – V. 10. – P. 49–64.
151. Christensen, C. A. Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in *Arabidopsis* / C. A. Christensen, S. Subramanian, G. N. Drews // *Dev. Biol.* – 1998. – V. 202. – P. 136–151. – doi: 10.1006/dbio.1998.8980.
152. Christensen, C.A. Mitochondrial *GFA2* is required for synergid cell death in *Arabidopsis* / C.A. Christensen, S.W. Gorsich, R.H. Brown, L.G. Jones, J. Brown, J.M. Shaw, G.N. Drews // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 2215-2232. – doi: 10.1105/tpc.002170.

153. Ciechanover, A. Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction / A. Ciechanover, A. Orian, A.L. Schwartz // *Bioessays*. – 2000. – V. 22. – P. 442–451.
154. Ciechanover, A. (2014). The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome / A. Ciechanover, A. Stanhill // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – V. 1843. – P. 86–96. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.007
155. Claros, M. Why assembling plant genome sequences is so challenging / Claros M., Bautista R., Guerrero-Fernández D., Benzerki H., Seoane P., Fernández-Pozo N. // *Biology*. – 2012. – V. 1. – P. 439–459. – doi: 10.3390/biology1020439
156. Clough, S.J. Floral dip: A simplified method for *Arabidopsis*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Clough, A.F. Bent // *Plant J*. – 1998. – V. 16 (6). – P. 735–743. – doi: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x.
157. Colón-Carmona, A. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein / A. Colón-Carmona, R. You, T. Haimovitch-Gal, P. Doerner // *Plant J*. – 1999. – V. 20. – P. 503–508.
158. Conesa, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis / A. Conesa, P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, et al. // *Genome Biol*. – 2016. – V. 1:13. – doi: 10.1186/s13059-016-0881-8.
159. Conner, J.A. Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus* / J.A. Conner, S. Goel, G. Gunawan, M.M. Cordonnier-Pratt, V.E. Johnson, et al. // *Plant Physiol*. – 2008. – V. 147(3). – P. 1396–411. – doi: 10.1104/pp.108.119081.
160. Conner J.A. Recombination within the apospory specific genomic region leads to the uncoupling of apomixis components in *Cenchrus ciliaris* / J.A. Conner, G. Gunawan, P. Ozias-Akins // *Planta*. – 2013. – V. 238(1). – P. 51–63. – doi: 10.1007/s00425-013-1873-5. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23553451.
161. Conner, J. A. Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants / J. A. Conner, P. Ozias-Akins // *Methods Mol. Biol*. – 2017. – V. 1669. – P. 17–34.

162. Cornaro, L. Asexual reproduction through seeds: the complex case of diplosporous apomixis / L. Cornaro, C. Banfi, M. Cucinotta, L. Colombo, P.J. van Dijk / *J Exp Bot.* – 2023. – V.16:erad054. – doi: 10.1093/jxb/erad054.
163. Corral, J. M. A conserved apomixis-specific polymorphism is correlated with exclusive exonuclease expression in premeiotic ovules of apomictic *Boechera* species / J. M. Corral, H. Vogel, O. M. Aliyu, G. Hensel, T. Thiel, J. Kumlehn, et al. // *Plant Phys.* – 2013. – V. 163. – P. 1660–1672. – doi: 10.1104/pp.113.222430.
164. Coulter, J. M. *Morphology of Spermatophytes* / J. M. Coulter, C. J. Chamberlain. – New York: D Appleton and Company publisher, 1901.
165. Crane, C. F. (2001). Classification of apomictic mechanisms / C. F. Crane. – *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, eds Y. Savidan, J. G. Carman, and T. Dresselhaus. – Mexico: D.E. CIMMYT, 2001. – 243 PP.
166. Creasey, K.M. miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis* / K.M. Creasey, J. Zhai, F. Borges, F. Van Ex, M. Regulski, B.C. Meyers, R.A. Martienssen // *Nature.* – 2014. – V. 508(7496). – P. 411-5. – doi: 10.1038/nature13069.
167. Criqui, M.C. Mitosis in plants: How far we have come at the molecular level? / M.C. Criqui, P. Genschik // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – V. 5. – P. 487–493.
168. Cromer, L. OSD1 promotes meiotic progression via APC/C inhibition and forms a regulatory network with TDM and CYCA1;2/TAM / L. Cromer, J. Heyman, S. Touati, H. Harashima, E. Araou, et al. // *PLoS Genet.* – 2012. – V. 8(7):e1002865. – doi: 10.1371/journal.pgen.1002865.
169. Crow, J.F. (1965). Evolution in sexual and asexual populations / J.F. Crow, M. Kimura // *Am Nat.* – 1965. – V. 99. – P. 439–450.
170. da Costa-Nunes, J. A. Unveiling the gene expression profile of pollen / J. A. da Costa-Nunes, U. Grossniklaus // *Genome Biol.* – 2003. – V. 5. – P. 205.1–205.3.

171. Cubas, P. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry / P. Cubas, C. Vincent, E. Coen // *Nature*. – 1999. – V. 401(6749). – P. 157-61. – doi: 10.1038/43657.
172. Cui, H.H. *ABORTED GAMETOPHYTE 1* is required for gametogenesis in *Arabidopsis* / H.H. Cui, H.Z. Liao, Y. Tang, X.Y. Du, et al. // *J Integr Plant Biol*. – 2015. – V. 57(12). – P. 1003-16. – doi: 10.1111/jipb.12341.
173. Curtis, M.D. Molecular control of autonomous embryo and endosperm development / M.D. Curtis, U. Grossniklaus // *Sex. Plant Reprod*. – 2007. – V. 21. – P. 79–88.
174. Darlington, C.D. *Evolution of Genetic Systems* / C.D. Darlington. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1939.
175. Darlington, C.D. *Evolution of Genetic Systems* / C.D. Darlington. – London: US Dept. of Agriculture, Oliver & Agricultural Research Service, 1958. – P. 31–36.
176. Darwin, C.R. On the two forms, or dimorphic condition, in the species of *Primula*, and on their remarkable sexual relations. / C.R. Darwin // *J Proc Linn Soc Lond (Botany)*. – 1862a. – V. 6. – P. 77–96.
177. Darwin, C.R. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing / C.R. Darwin – London: John Murray, 1862b.
178. Darwin, C.R. The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom / C.R. Darwin – London: John Murray, 1876.
179. Das, B. Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae* / B. Das, J.S. Butler, F. Sherman // *Mol. Cell. Biol*. – 2003. – V. 23. – P. 5502–5515.
180. Davis, C.A. Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae* / C.A. Davis, M. Ares, Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – V. 103. – P. 3262–3267.

181. Day, R. C. Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells / R. C. Day, U. Grossniklaus, R. C. Macknight // Trends Plant Sci. – 2005. – V. 10. – P. 397–406.
182. de Almeida Engler, J. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia / J. de Almeida Engler, V. De Vleeschauwer, S. Burssens, J.L. Celenza, D. Inze', M. van Montagu, G. Engler, G. Gheysen // Plant Cell. – 1999. – V. 11. – P. 793–808.
183. Delaat, A. M. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry / A. M. Delaat, W. Gohde, M. Vogelzakg // Plant breeding. – 1987. – V. 99, 4. – P. 303-307.
184. de Napoles, M. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation / M. de Napoles, J.E. Mermoud, R. Wakao, Y.A. Tang, M. Endoh, et al. // Dev Cell. – 2004. – V. 7. – P. 663–676.
185. Den Elzen, N. Cyclin a is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase / N. Den Elzen, J. Pines // J. Cell Biol. – 2001. – V. 153. – P. 121-135.
186. d'Erfurth, I. The cyclin-A CYCA1;2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with *OSDI* for the prophase to first meiotic division transition / I. d'Erfurth, L. Cromer, S. Jolivet, C. Girard, C. Horlow, Y. Sun, et al. // PLoS Genet. – 2010. – V. 6:e1000989. – doi: 10.1371/journal.pgen.1000989
187. Deshaies, R.J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases / R.J. Deshaies // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 1999. – V. 15. – P. 435–467.
188. Dieterle, M. Molecular and functional characterisation of *Arabidopsis* Cullin 3A / M. Dieterle, A., Thomann, J.-P. Renou, Y. Parmentier, V. Cognat, G. Lemonnier, R. Müller, W.-H. Shen, T. Kretsch, P. Genschik // Plant J. – 2005. – V. 41. – P. 386–399.
189. Dobeš, C. H. Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabidopsis drummondii*, *a. x*

- divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae) / C. H. Dobeš, T. Mitchell-Olds, M. A. Koch // Mol. Ecol. – 2004a. – V. 13. – P. 349–370.
190. Dobeš, C. H. Intraspecific diversification in North American *Boechea stricta* (*Arabis drummondii*), *Boechea divaricarpa*, and *Boechea holboellii* (Brassicaceae) inferred from nuclear and chloroplast molecular markers / C. H. Dobeš, T. Mitchell-Olds, M. A. Koch // Am. J. Bot. – 2004b. – V. 91. – P. 2087–2101. – doi: 10.3732/ajb.91.12.2087.
191. Doelling, J.H. The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in *Arabidopsis thaliana* / J.H. Doelling, N. Yan, J. Kurepa, J. Walker, R.D. Vierstra // Plant J. – 2001. – V. 27. – P. 393–405.
192. Donnelly, P.M. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis* / P.M. Donnelly, D. Bonetta, H. Tsukaya, R.E. Dengler, N.G. Dengler // Dev. Biol. – 1999. – V. 215. – P. 407–419.
193. Doyle, J. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy / J. Doyle // Syst. Bot. – 1992. – V. 17. – P. 144–163. – doi: 10.1093/sysbio/syu048
194. Dresselhaus, T. Cell-cell communication during double fertilization / T. Dresselhaus // Curr Opin Plant Biol. – 2006. – V. 9. – P. 41-47.
195. Dresselhaus, T. Fertilization mechanisms in flowering plants / T. Dresselhaus, S. Sprunck, G. M. Wessel // Curr. Biol. – 2016. – V. 26. - P 125–139. – doi: 10.1016/j.cub.2015.12.032.
196. Drews, G.N. The female gametophyte / G.N. Drews, A.M. Koltunow // Arabidopsis Book. – 2011. – V. 9. – P. e0155. – doi: 10.1199/tab.0155.
197. Drews, G. N. Genetic analysis of female gametophyte development and function / G. N. Drews, D. Lee, C. A. Christensen // Plant Cell. – 1988. – V. 10. – P. 5–18.
198. Dumbliauskas, E. The *Arabidopsis* CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting / E. Dumbliauskas, E. Lechner, M. Alioua, V. Cognat, V. Brukhin, et al. // EMBO J. – 2011. – V. 30(4). – P. 731-43.

199. Dziembowski, A. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity / A. Dziembowski, E. Lorentzen, E. Conti, B. Seraphin // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. – V. 14. – P. 15–22.
200. Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar // Nucleic Acids Res 32: 1792–1797.
201. Elkonin, L. Genetic Functions of Cytoplasm in Plants with Special Emphasis on Sorghum / L. Elkonin, O. Kibalnik, A. Zavalishina, G. Gerashchenkov, N. Rozhnova. – In: Chloroplasts and Cytoplasm: Structure and Functions; Eds: C. Dejesus, L. Trask. Nova Science Publishers, 2018. – P.97-154.
202. Elsasser, S. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains / S. Elsasser, R.R. Gali, M. Schwickart, C.N. Larsen, D.S. Leggett, et al. // Nat. Cell Biol. – 2002. – V. 4. – P. 725–730.
203. Elsasser, S. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome / S. Elsasser, D. Chandler-Militello, B. Mueller, J. Hanna, D. Finley // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – P. 26817–26822.
204. Escobar-Restrepo, J.M. The *FERONIA* receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception / Escobar- J.M. Restrepo, N. Huck, S. Kessler, V. Gagliardini, J. Gheyselinck, et al. // Science. – 2007. – V. 317. – P. 656-860.
205. Estevez, A.M. The exosome of Trypanosoma brucei / A.M. Estevez, T. Kempf, C. Clayton // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 3831–3839.
206. Estevez, A.M. (2003). The roles of intersubunit interactions in exosome stability / Estevez A.M., Lehner B., Sanderson C.M., Ruppert T., Clayton C. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 34943–34951.
207. Exner, V. Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development / V. Exner, P. Taranto, N. Schönrock, W. Gruissem, L. Hennig // Development. – 2006. – V. 133. – P. 4163–4172.
208. Evans, M. M. S. Interaction between maternal effect and zygotic effect mutations during maize seed development / M. M. S. Evans, J. L. Kermicle // Genetics. – 2001. – V. 159. – P. 303–315.

209. Evtushenko, E.V. Cytogenetic and Molecular Characteristics of Rye Genome in Octoploid *Triticale* (\times *Triticosecale* Wittmack) / E.V. Evtushenko, Y.A. Lipikhina, P.I. Steepochkin, A.V. Vershinin // *Comp. Cytogenet.* – 2019. – V. 13. – P. 423–434.
210. Fagerlind, F. Embryosack von *Plumbagella* und *Plumbago* / F. Fagerlind // *Arkiv. För Bot.* – 1938. – V. 29B. – P. 1–8.
211. Fagerlind, F. Die Terminologie der Apomixis-Prozesse / F. Fagerlind // *Hereditas.* – 1940. – Bd. 26, H. 1. – S. 1-22.
212. Feil, R. (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals / R. Feil, F. Berger // *Trends Genet.* – 2007. – V. 23. – P. 192–199.
213. Feldmann, K.A. Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development / K.A. Feldmann, D.A. Coury, M.L. Chistianson // *Genetics.* -1997. – V. 147. – P. 1411-22.
214. Felsenstein, J. The evolutionary advantage of recombination / J. Felsenstein // *Genetics.* – 1974. – V. 78(2). – P. 737-56. – doi: 10.1093/genetics/78.2.737.
215. Ferreira de Carvalho J. Recent and dynamic transposable elements contribute to genomic divergence under asexuality / J. Ferreira de Carvalho, V. de Jager, T. P. van Gorp, N. C. Wagemaker, K. J. F. Verhoeven // *BMC Genomics.* – 2016. – V. 17. – P. 884. – doi: 10.1186/s12864-016-3234-9
216. Figueroa, P. *Arabidopsis* Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo / P. Figueroa, G. Gusmaroli, G. Serino, et al. // *Plant Cell.* – 2005. – V. 17. – P. 1180–1195.
217. Filonova, L.H. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm Norway spruce / L.H. Filonova, P.V. Bozhkov, V.B. Brukhin, G. Daniel, B. Zhivotovsky, S. von Arnold // *J Cell Sci.* – 2000. – V. 113 (24). – P. 4399-4411.
218. Fisher, R.A. The genetical theory of natural selection Complete variorum edition / R.A. Fisher. – Oxford: Oxford University Press, 1999.

219. Florez-Rueda, A. Laser-assisted microdissection (LAM) as a tool for transcriptional profiling of individual cell types / A., Florez-Rueda, U. Grossniklaus, A. Schmidt // *J. Vis. Exp.* – 2016. – V. 111:53916. – doi: 10.3791/53916
220. Fobert, P.R. Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants / P.R., Fobert, E.S. Coen, G.J.P. Murphy, J.H. Doonan // *EMBO J.* – 1994. – V. 13. – P. 616–624.
221. Friml, J. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* / J. Friml, A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, et al. // *Nature.* – 2003. – V. 426(6963). – P. 147-53. – doi: 10.1038/nature02085.
222. Fu, H. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and COP9 signalosome / H. Fu, N. Reis, Y. Lee, Y., M. Glickman, R.D. Vierstra // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 7096–7107.
223. Furukawa, M. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases / M. Furukawa, Y.J. He, C. Borchers, Y. Xiong // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – V.5. – P. 1001–1007.
224. Galla, G. Ovule Gene Expression Analysis in Sexual and Aposporous Apomictic *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) Accessions / G. Galla, A. Basso, S. Grisan, M. Bellucci, F. Pupilli, G. Barcaccia // *Front Plant Sci.* – 2019. – V. 10:654. – doi: 10.3389/fpls.2019.00654. PMID: 31178879; PMCID: PMC6543059.
225. Gallois, J.L. The *Arabidopsis* proteasome RPT5 subunits are essential for gametophyte development and show accession-dependent redundancy / J.L. Gallois, A. Guyon-Debast, A. Lécureuil, D. Vezon, V. Carpentier, S. Bonhomme, P. Guerche // *The Plant Cell.* – 2009. – V. 21(2). – P. 442-459.
226. Gao, L. Pharmacologically Induced Meiosis Apomeiosis Interconversions in *Boechera*, *Arabidopsis* and *Vigna*: Ph.D. Thesis / Gao L. – Utah State University, Logan, UT, USA, 2018.
227. Garcia-Aguilar, M. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes / M. Garcia-Aguilar, C.

- Michaud, O. Leblanc, D. Grimanelli // *Plant Cell*. – 2010. V. 22(10). – P. 3249-67. – doi: 10.1105/tpc.109.072181.
228. Gasteiger, E. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch – Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2005. – P. 571–607.
229. Geerts, J. M. Beiträge zur Kenntnis der cytologischen Entwicklung von *Oenothera lamarckiana* / J. M. Geerts // *Ber. Deutsch. Bot. Gesell.* – 1908. – V. 26A. – P. 608–614.
230. Gehring, M. Epigenetic dynamics during flowering plant reproduction: evidence for reprogramming? / M. Gehring // *New Phytol.* – 2019. – V. 224(1). – P. 91-96. – doi: 10.1111/nph.15856.
231. Gehring, M. DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation / M. Gehring, J.H. Huh, T.F. Hsieh, J. Penterman, et al. // *Cell*. – 2006. – V. 124. – P. 495–506.
232. Geldner, N. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking / N. Geldner, J. Friml, Y.D. Stierhof, G. Jürgens, K. Palme // *Nature*. – 2001. – V. 413. – P. 425-428. – doi: 10.1038/35096571. PMID: 11574889.
233. Geldner, N. The *Arabidopsis GNOM ARF-GEF* mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth / Geldner N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, et al. // *Cell*. – 2003. – V. 112. – P. 219-230. – doi: 10.1016/s0092-8674(03)00003-5. PMID: 12553910.
234. Geldner, N. Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis* / N. Geldner, S. Richter, A. Vieten, S. Marquardt, R.A. Torres-Ruiz, U. Mayer, G. Jürgens // *Development*. – 2004. – V. 131. – No. 2. – P. 389-400. – doi: 10.1242/dev.00926.
235. Gelvin, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool / S. B. Gelvin // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. – P. 16–37. – doi: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003

236. Genschik, P. Cell cycle-dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132 / P. Genschik, M.C. Criqui, Y. Parmentier, A. Derevier, J. Fleck // *Plant Cell*. – 1998. – V. 10. – P. 2063–2076.
237. Geyer, R. BTB/ POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases / R. Geyer, S. Wee, S. Anderson, J. Yates, D.A. Wolf // *Mol. Cell*. – 2003. – V. 12. – P. 783–790.
238. Gieffers, C. Cullins and cell cycle control / C. Gieffers, A. Schleiffer, J.M. Peters // *Protoplasma*. – 2000. – V. 211. – P. 20–28.
239. Gill, G. Effect of drought on herbivore-induced plant gene expression: population comparison for range limit inferences / G. Gill, R. Haugen, S. Matzner, A. Barakat, D. Siemens // *Plants*. – 2016. – V. 5:13. – doi: 10.3390/plants5010013
240. Gingerich, D.J. Cullin 3A and B assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-A-brac (BTB) / D.J. Gingerich, J.M. Gagne, D.W. Salter, H. Hellmann, M. Estelle, R.D. Vierstra // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – №18. – P. 810–18 821.
241. Girod, P.A. Multi-ubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens* / P.A. Girod, H.Y. Fu, J.P. Zryd, R.D. Vierstra // *Plant Cell*. – 1999. – V. 11. – P. 1457–1471.
242. Glas, R. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function / R. Glas, M. Bogyo, J.S. McMaster, M. Gaczynska, H.L. Ploegh // *Nature*. – 1998. – V. 392. – P. 618–622.
243. Glémin, S. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants / S., Glémin, E., Bazin, D. Charlesworth // *Proc. R. Soc.* – 2006. – V. B 273. – P. 3011–3019. – doi: 10.1098/rspb.2006.3657
244. Glickman, M.H. Getting in and out of the proteasome. Semin / M.H. Glickman // *Cell Dev. Biol.* – 2000. – V. 11. – P. 149–158.
245. Goeres, D.C. Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development / D.C. Goeres, J.M. Van Norman, W.

- Zhang, N.A. Fauver, M.L. Spencer, L.E. Sieburth // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19. – P. 1549–1564.
246. Golden, T.A. *SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY*, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in *Arabidopsis* / T.A. Golden, S.E. Schauer, J.D. Lang, S., Pien, A.R. Mushegian, U. Grossniklaus, D.W. Meinke, A. Ray // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 130. – P. 808-822.
247. Goodstein, D.M. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics / D.M. Goodstein, S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R.D. Hayes, Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – 40(Database issue):D1178-86. – doi: 10.1093/nar/gkr944.
248. Graham, A.C. Differential distribution of exosome subunits at the nuclear lamina and in cytoplasmic foci / A.C. Graham, D.L. Kiss, E.D. Andrulis // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – V. 17. – P. 1399–1409.
249. Grant, V. 1981. *Plant Speciation* 2nd ed. / V. Grant. - New York: Columbia University Press.
250. Gray, W.M. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins / W.M. Gray, S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, M. Estelle // *Nature*. – 2001. – V. 414. – P. 271–276.
251. Grimanelli D. Developmental genetics of gametophytic apomixis / D. Grimanelli, O. Leblanc, E. Perotti, U. Grossniklaus // *Trends Genet.* – 2001. – V. 17. – P. 597–604. – doi: 10.1016/S0168-9525(01)02454-4
252. Grini, P. E. Isolation of ethyl-methanesul-fonate-induced gametophytic mutants in *Arabidopsis thaliana* by a segregation distortion assay using the multimarker chromosome 1 / P. E. Grini, A. Schnittger, H. Schwarz, I. Zimmermann, B. Schwab, G. Jürgens, M. Hülskamp // *Genetics*. – 1999. – V. 151. – P. 849–863.
253. Grini P. E., Jürgens G., Hülskamp M. (2002). Embryo and endosperm development is disrupted in the female gametophytic capulet mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 2002, 162, 1911–1925.

254. Grossniklaus, U. 2001. From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. In: Savidan Y., Carman J.G., Dresselhaus T. (eds.) *The Flowering of Apomixis: from Mechanisms to Genetic Engineering* / U. Grossniklaus. – Mexico, D.E: CIMMYT, IRD, European Commission DC VI (FAIR), 2001. – P. 168-211.
255. Grossniklaus, U. (2005). Genomic imprinting in plants: a predominantly maternal affair. In *Annual Plant Reviews: Plant Epigenetics*, (Meyer P, ed) / U. Grossniklaus. – Sheffield, UK: Blackwell, 2005. – P. 174–200.
256. Grossniklaus, U. A bright future for apomixis / U. Grossniklaus, A. M. Koltunow, M. van Lookeren-Campagne // *Trends Plant Sci.* – 1998. – V. 3. – P. 415–416. – doi: 10.1016/S1360-1385(98)01338-7
257. Grossniklaus, U. Engineering of apomixis in crop plants: what can we learn from sexual model systems. In: Vasil IK (Ed) *Plant Biotechnology 2002 & Beyond* / U. Grossniklaus, J.M. Moore, V. Brukhin, J. Gheyselinck, R. Baskar, J.-P. Vielle-Calzada, C. Baroux, D.R. Page, C. Spillane – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. – P.309-314. – DOI: 10.1007/978-94-017-2679-5_63.
258. Grossniklaus, U. How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis / U. Grossniklaus, G. A. Nogler, P. J. van Dijk // *Plant Cell.* – 2001a. – V. 13. – P. 1491–1498. – doi: 10.1105/tpc.13.7.1491.
259. Grossniklaus U., Paro R. (2014). Transcriptional silencing by polycomb-group proteins / U. Grossniklaus, R. Paro // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – V. 6(11):a019331. – doi: 10.1101/cshperspect.a019331.
260. Grossniklaus, U. The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development / U. Grossniklaus, K. Schneitz, // *Semin. Cell Dev. Biol.*– 1998. – V., 9. – P. 227–238.
261. Grossniklaus, U. Parental conflict and infanticide during embryogenesis / U. Grossniklaus, J.-P. Vielle-Calzada // *Trends Plant Sci.* – 1998. – V. 3. – P. 328.
262. Grossniklaus, U. Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a Polycomb group gene in *Arabidopsis* / U. Grossniklaus, J-P. Vielle-Calzada, M.A. Hoepfner, W.B. Gagliano // *Science.* – 1998. – V. 280. – P. 446-450. – DOI: 10.1126/science.280.5362.446.

263. Grossniklaus, U. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex / U. Grossniklaus, Spillane, D.R. Page, C. Koehler // *Curr Opin Plant Biol.* – 2001b. – V. 4(1). – P. 21-27.
264. Guitton , A.E. Loss of function of *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1* produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. / A.E. F. Guitton, Berger // *Curr Biol.* – 2005. – V. 15. – P. 750–754.
265. Guitton, A.E. Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana* / A.E. Guitton, D.R. Page, P. Chambrier, C. Lionnet, et al. // *Development.* – 2004. – V. 131(12). – P. 2971-81. – doi: 10.1242/dev.01168.
266. Guo, H. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor / H. Guo, J.R. Ecker // *Cell.* 2003. – V. 115. – P. 667–677.
267. Gustafsson, A. Apomixis in higher plants / A. Gustafsson // Pt. I-II. Lunds. univ. Arsskrift. - 1946. – Bd. 42. – S .1-68.
268. Gustafsson A. Apomixis in higher plants / Gustafsson A. // Pt. III. Lunds. univ. Arsskrift. – 1947. – Bd. 43. – S. 69-370.
269. Hamann, T. The *Arabidopsis BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning / T. Hamann, E. Benkova, I. Baurle, M. Kientz, G. Jürgens // *Genes Dev.* – 2002. – V.16. – P. 1610–1615.
270. Hamann, T. The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in *Arabidopsis* / T. Hamann, U. Mayer, G. Jürgens // *Development.* – 1999. – V. 126. – P. 1387–1395.
271. Hampton, R.Y. Role of 26S proteasome and *HRD* genes in the degradation of 3-hydroxy-3- methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein / R.Y. Hampton, R.G. Gardner, J. Rine // *Mol. Biol. Cell.* – 1996. – V. 7. – P. 2029–2044.

272. Hand, M. L. The genetic control of apomixis: asexual seed formation / M. L. Hand, A. M. G. Koltunow // *Genetics*. – 2014. – V. 197. – P. 441–450. – doi: 10.1534/genetics.114.163105
273. Hand, M. L. Evolution of apomixis loci in *Pilosella* and *Hieracium* (Asteraceae) inferred from the conservation of apomixis-linked markers in natural and experimental populations / M. L. Hand, P. Vít, A. Krahulcová, K. Oelkers, et al. // *Heredity*. – 2015. – V. 114. – P. 17–26. – doi: 10.1038/hdy.2014.61
274. Hardtke, C.S. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development / C.S. Hardtke, T. Berleth // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – P. 1405–1411.
275. Havens, C.G. Docking of a specialized PIP Box onto chromatin bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2 / C.G. Havens, J.C. Walter // *Mol Cell*. – 2009. – V. 35. – P. 93–104. – doi: 10.1016/j.molcel.2009.05.012.
276. He, Y.J. DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases / Y.J. He, C.M. McCall, J. Hu, Y. Zeng, Y. Xiong // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – P. 2949–2954.
277. Hellmann, H. Plant development regulation by protein degradation / H. Hellmann, M. Estelle // *Science*. – 2002. – V. 297. – P. 793–797.
278. Hellmann, H. *Arabidopsis* *AXR6* encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis / H. Hellmann, L. Hobbie, A. Chapman, S. Dharmasiri, N. Dharmasiri, C. del Pozo, D. Reinhardt, M. Estelle // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – P. 3314–3325.
279. Henics, T. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features / T. Henics, D. N. Wheatley // *Biol. Cell*. – 1999. – V. 91. – P. 485–498.
280. Hennig, L. MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes / L. Hennig, R. Bouveret, W. Gruissem // *Trends Cell Biol.* – 2005. – V. 15. – P. 295–302.

281. Heslop-Harrison, J. The forgotten generation: some thoughts on the genetics and physiology of angiosperm gametophytes / Heslop- J. Harrison // The Bateson Lecture: Proceedings of the Fourth John Innes Symposium. – P. 1–14.
282. Higa, L.A. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation / L.A. Higa, M. Wu, T. Ye, R. Kobayashi, H. Sun, H. Zhang // Nat Cell Biol. – 2006. – V. 8. – P. 1277–1283.
283. Higa, L.A. Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy / L.A. Higa, H. Zhang // Cell Div. – 2007. – V. 2. – P. 5.
284. Higo, A. DNA methylation is reconfigured at the onset of reproduction in rice shoot apical meristem / A. Higo, N. Saihara, F. Miura, Y. Higashi, M. Yamada, et al. // Nat Commun. – 2020. – V. 11(1). P. 4079. – doi: 10.1038/s41467-020-17963-2.
285. Hill, W.G. The effect of linkage on limits to artificial selection / W.G. Hill, A. Robertson // Genetics Research. – 1966. – V. 8. – P. 269–294. – doi: 10.1017/S0016672300010156
286. Hirsch, C. N. Tapping the promise of genomics in species with complex, nonmodel genomes / C. N. Hirsch, C. R. Buell // Annu. Rev. Plant Biol. – 2013. – V. 64. – P. 89–110. – doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120237
287. Hobbie, L. The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development / L. Hobbie, M. McGovern, L.R. Hurwitz, A. Pierro, et al. // Development. – 2000. – V. 127. – P. 23–32.
288. Hofmeister, W. Untersuchungen des Vorgangs bei der Befruchtung der Oenotheren / W. Hofmeister // Bot. Ztg. – 1847. – V. 5. – P. 785–792.
289. Hojsgaard, D.H. Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics / D.H. Hojsgaard, S. Klatt, R. Baier, J.G. Carman, E. Hoerandl // CRC Crit. Rev. Plant Sci. – 2014. – V. 33. – P. 414–427.
290. Hojsgaard, D.H. Transient activation of apomixis in sexual neotriploids may retain genomically altered states and enhance polyploid establishment / D.H.

- Hojsgaard // *Front. Plant Sc.* – 2018. – V. 9. – P. 230. – doi:10.3389/fpls.2018.00230.
291. Hong, E.J. A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation / E.J. Hong, J. Villen, E.L. Gerace, S.P Gygi., D. Moazed // *RNA Biol.* – 2005. – V. 2. – P. 106–111.
292. Honys, D. Male Gametophyte Development and Function. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* / D. Honys, D. Reňák, D. Twell // Teixeira da Silva, J.A., Ed.; Global Science Books, Ltd.: Ikenobe, Japan. – 2006. – V. 1. – P. 76–87.
293. Hooker, T.S. A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* / T.S. Hooker, P. Lam, H., Zheng, L. Kunst // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19. – P. 904–913.
294. Hörandl, E. (2006). The complex causality of geographical parthenogenesis / E. Hörandl // *New Phytol.* – 2006. – V. 171. – P. 525–538. – doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01769.x
295. Hörandl, E. The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis / E. Hörandl, F. Hadacek // *Plant Reprod.* – 2013. – V. 26(4). – P. 351-67. – doi: 10.1007/s00497-013-0234-7.
296. Hörandl, E. The evolution of apomixis in angiosperms: a reappraisal / E. Hörandl, D. Hojsgaard // *Plant Biosyst.* – 2012. – V. 146. – P. 681–693. – doi: 10.1080/11263504.2012.716795
297. Hou, Y. MIME-Mitosis instead of meiosis and its application in crop apomixis / Y. Hou, G. Gong, Z. Peng, Q. Dong, A. Luo, Q. Hong // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* – 2020. – V. 36(4). – P. 612-621. Chinese. – doi: 10.13345/j.cjb.190225. PMID: 32347056.
298. Houalla, R. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome / R. Houalla, F. Devaux, A. Fatica, J. Kufel, D. Barrass, C. Torchet, D. Tollervey // *Yeast.* – 2006. – V. 23. – P. 439–454.

299. Houseley, J. RNA-quality control by the exosome / J. Houseley, J. LaCava, D. Tollervey // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – V. 7. – P. 529–539.
300. Howden, R. Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis* / R. Howden, S. K. Park, J. M. Moore, J. Orme, U. Grossniklaus, D. Twell // *Genetics.* – 1998. – V. 149. – P. 621–631. – doi: 10.1093/genetics/149.2.621.
301. Howell, S.H. (2000). *Molecular Genetics of Plant Development* / S.H. Howell. – Cambridge: Cambridge University Press, 2000. – 384 PP.
302. Hruz, T. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes / T. Hruz, O. Laule, G. F. Szabo, Wessendorp, S. Bleuler, L. Oertle, et al. // *Adv. Bioinformat.* – 2008. – V. 2008(420747). – P. 1-5. – doi: 10.1155/2008/420747.
303. Hsieh, T.F. Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm / T.F. Hsieh, C.A. Ibarra, P. Silva, A. Zemach, L. Eshed-Williams, R.L. Fischer, D. Zilberman // *Science.* – 2009. – V. 324(5933). – P. 1451-4. – doi: 10.1126/science.1172417.
304. Huanca-Mamani, W. CHR11, a chromatin-remodeling factor essential for nuclear proliferation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana* / W. Huanca-Mamani, M. Garcia-Aguilar, G. León-Martínez, U. Grossniklaus, J.-P. Vielle-Calzada // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – V. 102(47). – P. 17231-6. – doi: 10.1073/pnas.0508186102.
305. Huang, C.-N. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining / C.-N. Huang, M. J. Cornejo, D. S. Bush, R. L. Jones // *Protoplasma.* – 1986. – V. 135. – P. 80-87.
306. Huang, C. H. Resolution of Brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution / C. H. Huang, R. Sun, Y. Hu, L. Zeng, N. Zhang, L. Cai, et al. // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33. – P. 394–412. – doi: 10.1093/molbev/msv226
307. Huck, N. The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception / N. Huck, J.M. Moore, M. Federer, U.

- Grossniklaus // *Development*. – 2003. – V. 130(10). – P. 2149-59. – doi: 10.1242/dev.00458.
308. Huerta-Cepas, J. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic, and viral sequences / J. Huerta-Cepas, D. Szklarczyk, K. Forslund, H. Cook, D. Heller, et al. *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44(D1). – P. 286-93. – doi: 10.1093/nar/gkv1248.
309. Ibarra, C.A. Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes / C.A. Ibarra, X. Feng, V.K. Schoft, T.F. Hsieh, R. Uzawa, J.A. Rodrigues, et al. // *Science*. – 2012. - V. 337(6100). – P. 1360-1364. – doi: 10.1126/science.1224839.
310. Ingouff, M. Zygotic resetting of the *HISTONE 3* variant repertoire participates in epigenetic reprogramming in *Arabidopsis* / M. Ingouff, S. Rademacher, S. Holec, L. Soljić, N. Xin, A. Readshaw, et al. // *Curr Biol*. – 2010. – V. 20(23). – P.2137-43. – doi: 10.1016/j.cub.2010.11.012.
311. Ingouff, M. Live-cell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in *Arabidopsis* reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM / M. Ingouff, B. Selles, C. Michaud, T.M. Vu, F. Berger, A.J. D. Schorn, Autran // *Genes Dev.* – 2017. – V. 31(1). – P. 72-83. – doi: 10.1101/gad.289397.116.
312. Hulse-Kemp, A. M. Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library / Hulse- A. M. Kemp, S. Maheshwari, K. Stoffel, T. A. Hill, D. Jaffe, S. R. Williams, et al. // *Hort. Res.* – 2018. – V. 5:4. – doi: 10.1038/s41438-017-0011-0
313. Jakobsson, M. The relationship between Fst and the frequency of the most frequent allele / M. Jakobsson, M. D. Edge, N. A. Rosenberg // *Genetics*. – 2013. – V. 193. – P. 515–528. – doi: 10.1534/genetics.112.144758
314. Jackson, P.K. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases / P.K. Jackson, A.G. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J.Y. Hsu, B.K. Kaiser, J.D. Reimann // *Trends Cell Biol.* – 2000. – V. 10. – P. 429–439.

315. Jefferson, R. A. Apomixis: a social revolution for agriculture? / R. A. Jefferson // *Biotechnol. Dev. Monitor.* – 1994. – V. 19. – P. 14–16.
316. Jefferson, R.A. The potential impacts of apomixis: a molecular genetics approach. / R.A. Jefferson, R. Bicknell // *The Impact of Plant Molecular Genetics.* B.W.S. Sobral (Ed.). – Boston: Birkhiiuser, 1996. – P. 87-101.
317. Ji, H. TileMap: create chromosomal map of tiling array hybridizations / H. Ji, W.H. Wong // *Bioinformatics.* – 2005. – V. 21. – P. 3629–3636. – doi: 10.1093/bioinformatics/bti593.
318. Jia, S. Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin / S. Jia, R. Kobayashi, S.I. Grewal // *Nat Cell Biol.* – 2005. – V. 7. – P. 1007–1013.
319. Jiang, D. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb repressive complex 2 components / D. Jiang, Y. Wang, Y. Wang, Y. He // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – P. e3404.
320. Jin, J. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1 / J. Jin, E.E. Arias, J. Chen, J.W. Harper, J.C. Walter // *Mol Cell.* – 2006. – V. 23. – P. 709–721.
321. Johansen, D.A. *Plant Embryology* / D.A. Johansen – Waltham, MA: Chronica Botanica, 1950.
322. Johnson, D. S On the endosperm and embryo of *Peperomia pellucida* / Johnson D. S. // *Bot. Gaz.* – 1900. – V. 80. – P. 1–11.
323. Johnson, L.S. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure / L.S. Johnson, S.R. Eddy, E. Portugaly // *BMC Bioinformatics.* – 2010. – V. 11. – P. 431. – DOI: 10.1186/1471-2105-11-431
324. Johri, B.M. *Comparative Embryology of Angiosperms* / B.M. Johri, K.B. Ambegaakar, P.S. Srinivasta – N.Y.: Springer-Verlag, 1992. – V. 1/2. – 1221 p.
325. Johri, B.M. *Embryology of Angiosperms* / Ed. B.M. Johri. – Springer Science & Business Media Publ., 2012. – 834 p.

326. Jones, D.T. The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences / D.T. Jones, W.R. Taylor, J.M. Thornton // *Bioinformatics*. – 1992. – V. 8. – P. 275–282.
327. Jones-Rhoades, M.W. Genome-wide expression profiling of the *Arabidopsis* female gametophyte identifies families of small, secreted proteins / M.W. Jones-Rhoades, J.O. Borevitz, D. Preuss // *PLoS Genet*. – 2007. – V. 3. – P. 1848-1861.
328. Johnston, A.J. Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte / A.J. Johnston, P. Meier, J. Gheyselinck, S.E. Wuest, M. Federer, E. Schlagenhauf, J.D. Becker, U. Grossniklaus // *Genome Biol*. – 2007. – V. 8. – P. 204-209.
329. Jost, L. Gst and its relatives do not measure differentiation / L. Jost // *Mol. Ecol*. – 2008. – V. 17. – P. 4015–4026. – doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x
330. Jullien, P.E. Polycomb group complexes self-regulate imprinting of the Polycomb group gene *MEDEA* in *Arabidopsis* / P.E. Jullien, A. Katz, M. Oliva, N. Ohad, F. Berger // *Curr Biol*. – 2006. – V. 16. – P.486–492.
331. Jullien, P.E. Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis* / P.E. Jullien, A. Mosquna, M. Ingouff, T. Sakata, N. Ohad, F. Berger // *PLoS Biol*. – 2008. – V. 6. – P. e194.
332. Jürgens, G. *Arabidopsis*. In A Colour Atlas of Developing Embryos / G. Jürgens, U. Mayer. – Bard, J., ed, London: Wolfe Publishing, 1994. – P. 7–21.
333. Kadaba, S. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae* / S. Kadaba, A. Krueger, T. Trice, A.M. Krecic, A.G. Hinnebusch, J. Anderson // *Genes Dev*. – 2004. – V. 18. – P. 1227–1240.
334. Kadaba, S. Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA / S. Kadaba, X. Wang, J.T. Anderson // *RNA*. – 2006. – V. 12. – P. 508–521.
335. Kajitani, R. Efficient de Novo Assembly of Highly Heterozygous Genomes from Whole-Genome Shotgun Short Reads / R. Kajitani, K. Toshimoto, H.

- Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura, M. Okuno, M. Yabana, M. Harada, E. Nagayasu, H. Maruyama, et al. // *Genome Res.* – 2014. – V. 24. – P. 1384–1395.
336. Kannan, S. Patterns of alternative splicing vary between species during heat stress / S. Kannan, G. Halter, T. Renner, E. R. Waters // *AoB Plants.* – 2018. – V. 10:ply013. – doi: 10.1093/aobpla/ply013.
337. Kantama, L. Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes / L. Kantama, T. F. Sharbel, M. E. Schranz, T. Mitchell-Olds, S. de Vries, H. de Jong // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.104. – P. 14026–14031. – doi: 10.1073/pnas.070664710
338. Kapetanaki M.G. The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in Xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites / M.G. Kapetanaki, J. Guerrero-Santoro, D.C. Bisi, C.L. Hsieh C.L., V. iæ-Otrin, A.S. Levine // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2006. – V. 103. – P. 2588–2593.
339. Karimi-Ashtiyani, R. Point Mutation Impairs Centromeric *CENH3* Loading and Induces Haploid Plants / R. Karimi-Ashtiyani, T. Ishii, M. Niessen, N. Stein, S. Heckmann, M. Gurushidze, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – V. 112. – P. 11211–11216.
340. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K., Katoh, D.M., Standley // *Mol Biol Evol.* – 2013. – V. 30(4). – P. 772-80. – doi: 10.1093/molbev/mst010.
341. Kawakatsu, T. Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination / T. Kawakatsu, J.R. Nery, R. Castanon, J.R. Ecker // *Genome Biol.* – 2017. – V. 18(1). – P. 171. – doi: 10.1186/s13059-017-1251-x.
342. Kermicle, J. L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize / J. L. Kermicle // *Am. J. Bot.* – 1971. – V. 58. – P. 1–7.
343. Kiefer, C. *Boechera* or not? Phylogeny and phylogeography of eastern North American *Boechera* species (Brassicaceae) / C. Kiefer, C. Dobeš, M. A. Koch // *Taxon.* – 2009. – V. 58. – P. 1109–1121. – doi: 10.1002/tax.584005.

344. Kiefer C. Interspecies association mapping links reduced CG to TG substitution rates to the loss of gene-body methylation / C. Kiefer, E.M. Willing, W.B. Jiao, H. Sun, M. Piednoël, U. Hümann, et al. *Nat Plants*. – 2019. – V. 5(8). – P. 846-855. – doi: 10.1038/s41477-019-0486-9.
345. Kiesselbach, T. A. The structure and reproduction of corn / T. A. Kiesselbach. – Univ. Nebraska Coll. Agric. Exp. Station Res Bull. 161, 50th Anniversary Edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1949.
346. Kinoshita, T. Imprinting of the *MEDEA* Polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm / T. Kinoshita, R. Yadegari, J.J. Harada, R.B. Goldberg, R.L. Fischer // *Plant Cell*. – 1999. – V. 11. – P. 1945–1952.
347. Kinoshita, T. One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation / T. Kinoshita, A. Miura, Y. Choi, Y. Kinoshita, X. Cao, S.E. Jacobsen, R.L. Fischer, T. Kakutani // *Science*. – 2004. – V. 303. – P. 521–523.
348. Kipreos, E.T. The F-box protein family / E.T. Kipreos, M. Pagano // *Genome Biol*. – 2000. – V. 1 (5). – P. 3002.
349. Kirioukhova, O. Aberrant imprinting may underlie evolution of parthenogenesis / O. Kirioukhova, J. N. Shah, D. S. Larsen, M. Tayyab, N. E. Mueller, G., Govind, et al. // *Sci. Rep*. – 2018. – V. 8. – P. 10626. – doi: 10.1038/s41598-018-27863-27867
350. Kiyosue T., Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* Polycomb gene in *Arabidopsis* / T. Kiyosue, N. Ohad, R. Yadegari, M. Hannon, J. Dinneny, D. Wells, A. Katz, L. Margossian, J.J. Harada, R.B. Goldberg, R.L. Fischer // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1999. – V. 96. – P. 4186–4191.
351. Klepikova, A.V. A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling / A.V. Klepikova, A.S. Kasianov, E.S. Gerasimov, M.D. Logacheva, A.A. Penin // *Plant J*. – 2016. – V. 88(6). – P. 1058-1070. – doi: 10.1111/tpj.13312.

352. Kliver, S. KrATER (K-mer Analysis Tool Easy to Run) / S. Kliver, G. Tamazian, S.J. O'Brien, V. Brukhin, A. Komissarov – Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB 2017), 2017. – P. 128. – <https://github.com/mahajrod/KrATER>
353. Kliver, S. Assembly of the *Boechera retrofracta* Genome and Evolutionary Analysis of Apomixis-Associated Genes / S. Kliver, M. Rayko, A. Komissarov, E. Bakin, D. Zhernakova, K. Prasad, C. Rushworth, R. Baskar, D. Smetanin, J. Schmutz, D.S. Rokhsar, T. Mitchell-Olds, U. Grossniklaus, V. Brukhin // *Genes* (Basel). – 2018. – V. 9(4). – P. pii: E185. – doi: 10.3390/genes9040185.
354. Koch, M. A. Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae) / M. A. Koch, C. Dobes, T. Mitchell-Olds // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – V. 20. – P. 338–350. – doi: 10.1093/molbev/msg046.
355. Köhler, C. *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development / C. Köhler, L. Hennig, R. Bouveret, J. Gheyselinck, U. Grossniklaus, W. Gruissem // *EMBO J.* – 2003. – V. 22(18). – P. 4804-14. – doi: 10.1093/emboj/cdg444. PMID: 12970192.
356. Köhler, C. The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1* / C. Köhler, L. Hennig, C. Spillane, S. Pien, W. Gruissem, U. Grossniklaus // *Genes Dev.* – 2003. – V. 17. – P. 1540–1553.
357. Köhler, C. The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb group protein controls expression of *PHERES1* by parental imprinting / C. Köhler, D.R. Page, V. Gagliardini, U. Grossniklaus // *Nat Genet.* – 2005. – V. 37. – P. 28–30.
358. Köhler, C. Mechanisms and evolution of genomic imprinting in plants / C. Köhler, I. Weinhofer-Molisch // *Heredity.* – 2010. – V. 105. – P. 57–63.
359. Kolde, R. Pheatmap: Pretty Heatmaps. R Package [electronic resource] / R. Kolde // Version 1.0.12. – 2021. – Available online. – <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.

360. Koltunow, A.M. (1993). Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules / A.M. Koltunow // *Plant Cell*. – 1993. – V. 5. – P. 1425-1437. – doi: 10.1105/tpc.5.10.1425
361. Koltunow, A.M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization / A.M. Koltunow, R.A. Bicknell, A.M. Chaudhury // *Plant Physiol*. – 1995. – V. 108. – P. 1345-1352. – doi.org/10.1104/pp.108.4.1345.
362. Koltunow, A. M. Apomixis: a developmental perspective / A. M. Koltunow, U. Grossniklaus // *Annu. Rev. Plant Biol*. – 2003. – V. 54. – P. 547–574. – doi: 10.1146/annurev.arplant.54.110901.16084
363. Koltunow, A.M. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis / A.M. Koltunow, S.D. Johnson, J.C. Rodrigues, T. Okada, Y. Hu, T. Tsuchiya, et al. // *Plant J*. – 2011. V. 66(5). – P. 890-902. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04556.x. Epub 2011 Apr 26. PMID: 21418351.
364. Korbek, J. O. Genome assembly and haplotyping with Hi-C / J. O. Korbek, C. Lee // *Nat. Biotechnol*. – 2013. – V. 31. – P. 1099. – doi: 10.1038/nbt.2764
365. Kotani, Y. The *loss of apomeiosis (LOA)* locus in *Hieracium praealtum* can function independently of the associated large-scale repetitive chromosomal structure / Y. Kotani, S. Henderson, G. Suzuki, S. Johnson, T. Okada, H. Siddons, et al. // *New Phytol*. – 2014. – V. 201. – P. 973–981. – doi: 10.1111/nph.12574
366. Kozieradzka-Kiszkurno, M. Development of Embryo Suspensors for Five Genera of Crassulaceae with Special Emphasis on Plasmodesmata Distribution and Ultrastructure / Kozieradzka-Kiszkurno M., Majcher D., Brzezicka E., Rojek J., Wróbel-Marek J., Kurczyńska E. // *Plants (Basel)*. – 2020. – V. 9(3). – P.320. – doi: 10.3390/plants9030320.
367. Kronenberg, Z. N. FALCON-phase: integrating pacBio and Hi-C data for phased diploid genomes / Z. N. Kronenberg, R. J. Hall, S. Hiendleder, T. P. L. Smith, Sullivan, S. T. Williams, J. L., et al. // *bioRxiv*. – 2018. – doi: <https://doi.org/10.1101/327064>.

368. Krzywinski, M. Circos: an Information Aesthetic for Comparative Genomics / Krzywinski M. et al. // *Genome Res.* – 2009. – V. 19. – P. 1639-1645. – DOI: 10.1101/gr.092759.109.
369. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33. – P. 1870-1874. – DOI: 10.1093/molbev/msw054
370. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – V. 35. – P. 1547–1549.
371. Kurihara, Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions / Y. Kurihara, Y. Watanabe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 12753–12758.
372. Kuroiwa, T. Studies on the behaviour of mitochondrial DNA. Synthesis of mitochondrial DNA occurs actively in a specific region just above the quiescent center in the root meristem of *Pelargonium zonale* / T. Kuroiwa, M. Fujie, H. Kuroiwa, // *J. Cell Sci.* – 1992. – V.101. – P. 483-493.
373. Kurz, T. Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway / T. Kurz, L. Pintard, J.H. Willis, D.R. Hamill, P. Gonczy, M. Peter, B. Bowerman // *Science.* – 2002. – V. 295. – P. 1294– 1298.
374. Kwee, H. S. The NOMEGA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in *Arabidopsis* / H. S. Kwee, V. Sundaresan // *Plant J.* – 2003. – V. 36. – P. 853–866.
375. Kwon, C.S. Histone occupancy dependent and independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis* / C.S. Kwon, D. Lee, G. Choi, W.I. Chung // *Plant J.* – 2009. – V. 60. – P. 112–121.
376. Kyriakidou, M. Current strategies of polyploid plant genome sequence assembly / M. Kyriakidou, H. H. Tai, N. L. Anglin, D. Ellis, M. V. Strömvik // *Front. Plant Sci.* – 2018. – V. 9. – P. 1660. – doi: 10.3389/fpls.2018.01660

377. LaCava, J. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex / J. LaCava, J. Houseley, C. Saveanu, E. Petfalski, E. Thompson, A. Jacquier, D. Tollervey // *Cell*. – 2005. – V. 121. – P. 713–724.
378. Lalanne, E. Analysis of transposon insertion mutants highlights the diversity of mechanisms underlying male progamic development in *Arabidopsis* / E. Lalanne, C. Michaelidis, J.M. Moore, W. Gagliano, A. Johnson et al. // *Genetics*. – 2004. – V. 167. – P. 1975–1986.
379. Law, J.A. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals / J.A. Law, S.E. Jacobsen // *Nat Rev Genet*. – 2010. – V. 11(3). – P. 204–20. – doi: 10.1038/nrg2719.
380. Laux, T. Embryogenesis: A new start in life / T., Laux, G. Jürgens // *Plant Cell*. – 1997. – V. 9. – P. 989–1000.
381. Leamy, L. J. Large-scale adaptive divergence in *Boechera fecunda*, an endangered wild relative of *Arabidopsis* / L. J. Leamy, C. R. Lee, V. Cousins, I. Mujacic, A. J. Manzaneda, K. Prasad, et al. // *Ecol. Evol.* – 2014. – V. 4. – P. 3175–3186. – doi: 10.1002/ece3.1148
382. Lee, H. S. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids / H. S. Lee, Z. J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2001. – V. 98. – P. 6753–6758. – doi: 10.1073/pnas.121064698
383. Lee, M. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations / M. Lee, F. Kuo, G. Whitmore, J. Sklar // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – P. 9834–9839. – doi: 10.1073/pnas.97.18.9834
384. Lee, C. R. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation / C. R. Lee, T. Mitchell-Olds // *Mol. Ecol.* – 2011. – V. 20. – P. 4631–4642. – doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05310.x
385. Lee, C.R. Young inversion with multiple linked QTLs under selection in a hybrid zone / C.R. Lee, B. Wang, J.P. Mojica, T. Mandáková, K.V.S.K. Prasad, J.L. Goicoechea, N. Perera, et al. // *Nat Ecol Evol.* – 2017. – V. 1(5). – P.119. – doi: 10.1038/s41559-017-0119.

386. Lee, J.H. Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4- RING E3 ubiquitin ligases / J.H. Lee, W. Terzaghi, G. Gusmaroli, J.B. Charron, H.J. Yoon, H. Chen, Y.J. He, Y. Xiong, X.W. Deng // *Plant Cell*. – 2008. – V. 20. – P. 152–167.
387. Lee, J. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase / J. Lee, P. Zhou // *Mol Cell*. – 2007. – V. 26. – P. 775–780.
388. Leggett R.M. NextClip: an analysis and read preparation tool for Nextera Long Mate Pair libraries / R.M. Leggett, B.J. Clavijo, L. Clissold, M.D. Clark, M. Caccamo // *Bioinformatics*. – 2013. – V. 30. – P. 566-568. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btt702
389. Leggett, D.S. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function / D.S. Leggett, J. Hanna, A. Borodovsky, B. Crosas, M. Schmidt, R.T. Baker, T. Walz, H. Ploegh, D. Finley // *Mol. Cell*. – 2002. – V. 10. – P. 495–507.
390. Lermontova, I. Knockdown of *CENH3* in *Arabidopsis* Reduces Mitotic Divisions and Causes Sterility by Disturbed Meiotic Chromosome Segregation: Consequences of AtCENH3 Depletion / I. Lermontova, O. Koroleva, T. Rutten, J. Fuchs, V. Schubert, I. Moraes, D. Koszegi, I. Schubert // *Plant J*. – 2011. – V. 68. – P. 40–50. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04664.x.
391. Lermontova, I. Centromeric Chromatin and Its Dynamics in Plants / I. Lermontova, M. Sandmann, M. Mascher, A.-C. Schmit, M.-E. Chabouté // *Plant J*. – 2015. – V. 83 (1). – P. 4–17. – doi: 10.1111/tpj.12875.
392. Lescot, M. (2004). PlantCARE, a Database of Plant Cis-Acting Regulatory Elements and a Portal to Tools for in Silico Analysis of Promoter Sequences / M. Lescot // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30. – P. 325–327.
393. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25. – P. 1754-1760. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
394. Li, Y. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development / Y. Li, S. Kumar, W. Qian // *Plant Cell Rep*. – 2018. V. 37(1). – P. 77-85. – doi: 10.1007/s00299-017-2215-z.

395. Li, F.-W. *Boechea* microsatellite website: an online portal for species identification and determination of hybrid parentage / F.-W. Li, Rushworth, C. A. Beck J. B., Windham, M. D. // Database (Oxford). – 2017. – V. 2017(1). – P. :baw169. – doi: 10.1093/database/baw169
396. Libri, D. Interactions between mRNA export commitment, 30-end quality control, and nuclear degradation / D. Libri, K. Dower, J. Boulay, R. Thomsen, M. Rosbash, T.H. Jensen // Mol. Cell. Biol. – 2002. – V. 22. – P. 8254–8266.
397. Liu, C.M. The titan mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development / C.M. Liu, D.W. Meinke // Plant J. – 1998. – V. 16. – P. 21–31.
398. Liu, Y. G. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR / Y. G. Liu, N. Mitsukawa, T. Oosumi, R. F. Whittier // Plant J. – 1995. – V. 8. – P. 457–463.
399. Liu, Q. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome / Q. Liu, J.C. Greimann, C.D. Lima // Cell. – 2006. – V. 127. – P. 1223–1237.
400. Liu, Q. Erratum: Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome / Q. Liu, J.C. Greimann, C.D. Lima // Cell. – 2007. – V. 131. – P. 188–190.
401. Lovatt, D. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue / D. Lovatt, B. Ruble, J. Lee, Dueck, H. T. Kim, S. Fisher, et al. // Nat. Methods. – 2014. – V. 11. – P. 190–196. – doi: 10.1038/nmeth.2804.
402. Liu, X. Reversible phosphorylation of Rpn1 regulates 26S proteasome assembly and function / X. Liu, W. Xiao, Y. Zhang, S.E. Wiley, T. Zuo, Y. Zheng, et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2020. – V. 117(1). – P. 328–336. – doi: 10.1073/pnas.1912531117.
403. Löve, A. Nomenclatural notes on arctic plants / A. Löve, D. Löve // Bot. Not. – 1976. – V. 128. – P. 497–523.
404. Lovell, J.T. On the origin and evolution of apomixis in *Boechea* / J.T. Lovell, O.M. Aliyu, M. Mau, M.E. Schranz, M. Koch, C. Kiefer, B.H. Song, T.

- Mitchell-Olds, T.F. Sharbel // *Plant Reprod.* – 2013. – V. 26(4). – P. 309-15. – doi: 10.1007/s00497-013-0218-7.
405. Lovell, J.T. Mating system and environmental variation drive patterns of adaptation in *Boechera spatifolia* (Brassicaceae) / J.T. Lovell, K. Grogan, T. F. Sharbel, J. K. McKay // *Mol. Ecol.* – 2014. – V. 23. – P. 4486–4497. – doi: 10.1111/mec.12879
406. Lovell, J. T. Ecological genetics of range size variation in *Boechera spp.* (Brassicaceae) / J. T. Lovell, J. K. McKay // *Ecol. Evol.* – 2015. – V. 5. – P. 4962–4975. – doi: 10.1002/ece3.1746
407. Lovell, J. T. Mutation accumulation in an asexual relative of *Arabidopsis* / J. T. Lovell, R. J. Williamson, S. I. Wright, J. K. McKay, T. F. Sharbel // *PLoS Genet.* – 2017. – V. 13. – P. e1006550. – doi: 10.1371/journal.pgen.1006550.
408. Lowe, T.M. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence / T.M. Lowe, S.R. Eddy // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – V. 25. – P. 955-964. – DOI: 10.1093/nar/25.5.955.
409. Löytynoja, A. Phylogeny-aware alignment with PRANK / A. Löytynoja // *Methods Mol Biol.* 2014. – V. 1079. – P. 155-70. – doi: 10.1007/978-1-62703-646-7_10.
410. Lu, P. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes / P. Lu, R. Porat, J.A. Nadeau, S.D. O'Neill // *Plant Cell.* – 1996. – V. 8. – P. 2155-2168.
411. Lu, J. Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of *Arabidopsis* seeds / J. Lu, C. Zhang, D.C. Baulcombe, Z.J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – P. 5529–5534. – doi.org/10.1073/pnas.1203094109.
412. Lukowitz, W. Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLE* gene product / W. Lukowitz, U. Mayer, G. Jürgens // *Cell.* – 1996. V. 84(1). – P.61-71. – doi: 10.1016/s0092-8674(00)80993-9. PMID: 8548827.

413. Luo, D. Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum* / Luo D., Carpenter R., Copsey L., Vincent C., Clark J., Coen E. // *Cell*. – 1999. – V. 99(4). – P. 367-76. – doi: 10.1016/s0092-8674(00)81523-8.
414. Luo, R. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler / R. Luo, B. Liu, Y. Xie, Z. Li, W. Huang, J. Yuan, J. Tang // *Gigascience*. – 2012. – V. 1(1). – P. 18. – DOI: 10.1186/2047-217x-1-18.
415. Lynch, M. Destabilizing Hybridization, General-Purpose Genotypes and Geographic Parthenogenesis / M. Lynch // *Q. Rev. Biol.* – 2015. – V. 59. – P. 257–290.
416. Ma, H. (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants / H. Ma // *Annu. Rev. Plant Biol.*, – 2005. – V. 56. – P. 393–434.
417. Ma, H. Development of flowering plant gametophytes / H. Ma, V. Sundaresan // *Curr Top Dev Biol*. – 2010. – V. 91. – P. 379-412. – doi: 10.1016/S0070-2153(10)91013-2. PMID: 20705189.
418. Maddison, W. P. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting / W. P. Maddison, L. L. Knowles, T. Collins // *Syst. Biol.* – 2006. – V. 55. – P. 21–30. – doi: 10.1080/10635150500354928.
419. Manning, K. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening / K. Manning, M. Tör, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson, G.J. King, J.J. Giovannoni, G.B. Seymour // *Nat Genet.* – 2006. – V. 38(8). – P. 948-52. – doi: 10.1038/ng1841.
420. McCarthy, T.W. SRAssembler: Selective Recursive local Assembly of homologous genomic regions / T.W. McCarthy, Hc. Chou, V.P. Brendel // *BMC Bioinformatics*. – 2019. – V. 20. – P. 371. – <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2949-4>
421. Maheshwari, P. The angiosperm embryo sac / P. Maheshwari // *Bot. Rev.* – 1948. – V. 14. – P. 1–56.
422. Maheshwari, P. An Introduction to the Embryology of Angiosperms / P. Maheshwari. – New York: McGraw-Hill, 1950. – 453 p.

423. Maheshwari, P. The embryo sac of *Acalypha indica* L / P. Maheshwari, B. M. Johri // Beihefte Bot. Centbl. – 1941. – V. 61A. – P. 125–136.
424. Maheshwari, S. Naturally Occurring Differences in *CENH3* Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids / S. Maheshwari, E.H. Tan, A. West, F.C.H. Franklin, L. Comai, S.W.L. Chan // PLoS Genet. – 2015. – V. 11. – P. e1004970.
425. Makarevich, G. Different Polycomb group complexes regulate common target genes in *Arabidopsis* / G. Makarevich, O. Leroy, U. Akinci, D. Schubert, O. Clarenz, J. Goodrich, U. Grossniklaus, C. Kohler // EMBO. – 2006. – V. 7. – P. 947–952.
426. Makarevich, G. Mechanism of PHERES1 imprinting in *Arabidopsis* / G. Makarevich, C.B. Villar, A. Erilova, C. Kohler // J Cell Sci. – 2008. – V. 121. – P. 906–912.
427. Marrocco, K. Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle / K. Marrocco, M. Bergdoll, P. Achard, M.C. Criqui, P. Genschik // Curr Opin Plant Biol. 2010. – V. 13. – P. 631–639.
428. Mandáková, T. Karyotype evolution in apomictic *Boechera* and the origin of the aberrant chromosomes / T. Mandáková, M. E. Schranz, T. F. Sharbel, H. de Jong, M. A. Lysak // Plant J. – 2015. – V. 82. – P. 785–793. – doi: 10.1111/tpj.12849
429. Mansfield, S. G. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac / S. G. Mansfield, L. G. Briarty, S. Erni, // Can. J. Bot. – 1991. – V. 69. – P. 447–460.
430. Marchler-Bauer, A. CDD: NCBI's Conserved Domain Database / A. Marchler-Bauer, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L.Y. Geer, R.C. Geer, J. He, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, et al. // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – P. D222–D226.
431. Marimuthu, M.P.A. Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds / M.P.A. Marimuthu, S. Jolivet, M. Ravi, L. Pereira, J.N. Davda, L. Cromer, L. Wang, F.Nogue, S.W.L. Chan, I. Siddiqi, et al. // Science. – 2011. – V. 331. – P. 876.

432. Martínez, G. Role of small RNAs in epigenetic reprogramming during plant sexual reproduction / G. Martínez, C. Köhler // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2017. – V. 36. – P. 22–28. – doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.006.
433. Martínez, G. Developmental relaxation of transposable element silencing in plants: functional or byproduct? / G. Martínez, R.K. Slotkin // *Curr Opin Plant Biol.* – 2012. – V. 15(5). – P. 496-502. – doi: 10.1016/j.pbi.2012.09.001.
434. Mateo de Arias, M. Effects of plant stress on facultative apomixis in *Boechera* (Brassicaceae): Ph.D. thesis / M. Mateo de Arias. – Utah State University, Logan. – 2015.
435. Matsumura, H. SuperSAGE array: The direct use of 26-base-pair transcript tags in oligonucleotide arrays / H. Matsumura, K. H. Bin Nasir, K. Yoshida, A. Ito, G. Kahl, D. H. Krüger, et al. // *Nat. Methods.* – 2006. – V. 3. – P. 469–474. – doi: 10.1038/nmeth882
436. Matzk, F. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots / F. Matzk, A. Meister, I. Schubert // *Plant J.* – 2000. – V. 21. – P. 97–108. – doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x
437. Mau, M. The conserved chimeric transcript *UPGRADE2* is associated with unreduced pollen formation and is exclusively found in apomictic *Boechera* species / M. Mau, J. M. Corral, H. Vogel, M. Melzer, J. Fuchs, M. Kuhlmann, et al. // *Plant Phys.* – 2013. – V. 163. – P. 1640–1659. – doi: 10.1104/pp.113.222448
438. Mau, M. Hybrid apomicts trapped in the ecological niches of their sexual ancestors / M. Mau, J. T. Lovell, J. M. Corral, C. Kiefer, M. A. Koch, O. M. Aliyu, et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* – 2015. – V. 112. – P. 2357–2365. – doi: 10.1073/pnas.1423447112
439. May, B. P. Transposon mutagenesis in the study of plant development / B. P. May, R. A. Martienssen, // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2003. – V. 22. – P. 1–35.
440. Mayer, U. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo studies on the role of the *gnom* gene / U. Mayer, G. Buettner, G. Jürgens // *Development.* – 1993. – V. 117. – P. 149-162.

441. Mayer, U. Mutations in the *pilz* group genes disrupt the microtubule cytoskeleton and uncouple cell cycle progression from cell division in *Arabidopsis* embryo and endosperm / U. Mayer, U. Herzog, F. Berger, D. Inze, G. Jurgens // *Eur. J. Cell Biol.* – 1999. – V. 78. – P. 100–108.
442. Mayer, C. Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes / C. Mayer, K.M. Schmitz, J. Li, I. Grummt, R. Santoro // *Mol. Cell.* – 2006. – V. 22. – P. 351–361.
443. Meyers, B.C. Analysis of the transcriptional complexity of *Arabidopsis thaliana* by massively parallel signature sequencing / B.C. Meyers, T.H. Vu, S.S. Tej, H. Ghazal, M. Matvienko, V. Agrawal, J. Ning, C.D. Haudenschild // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 1006–1011.
444. Mayor, T. Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome substrates / T. Mayor, J.R. Lipford, J. Graumann, G.T. Smith, R.J. Deshaies // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2005. – V. 4. – P. 741–751.
445. Matzke, M.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity / M.A. Matzke, R.A. Mosher // *Nat Rev Genet.* – 2014. – V. 15(6). – P. 394–408. – doi: 10.1038/nrg3683.
446. McCormick, S. (2004). Control of male gametophyte development / S. McCormick // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 142–153.
447. McElver, J. The *TITAN5* gene of *Arabidopsis* encodes a protein related to the ADP ribosylation factor family of GTP binding proteins / J. McElver, D. Patton, M. Rumbaugh, C. Liu, L.J. Yang, D. Meinke // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 1379–1392.
448. McGinnis, K.M. The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase / K.M. McGinnis, S.G. Thomas, J.D. Soule, L.C. Strader, J.M. Zale, T.P. Sun, C.M. Steber // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15. – P. 1120–1130.

449. Meirmans, P. Assessing population structure: *fst* and related measures / P. Meirmans, P. Hedrick // *Mol. Ecol. Res.* – 2010. – V. 11. – P. 5–18. – doi: 10.1186/1471-2148-10-63
450. Messer, P. Can Population Genetics Adapt to Rapid Evolution? / P. Messer, S. Ellner, N. Hairston // *Trends Genet.* – 2016. – V. 32. – P. 408-418.
451. Meyers, B. C. Methods for transcriptional profiling in plants. be fruitful and replicate / B. C. Meyers // *Plant Phys.* – 2004. – V. 135. – P. 637–652. – doi: 10.1104/pp.104.040840
452. Michel, J.J. A role for *Saccharomyces cerevisiae* Cul8 ubiquitin ligase in proper anaphase progression / Michel J.J., McCarville J.F., Xiong Y. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 22828–22837.
453. Mieulet, D. Turning rice meiosis into mitosis / D. Mieulet, S. Jolivet, M. Rivard, L. Cromer, A. Vernet, P. Mayonove, L. Pereira, G. Droc, B. Courtois, E. Guiderdoni, R. Mercier // *Cell Res.* – 2016. – V. 11. – P. 1242-1254. – doi: 10.1038/cr.2016.117.
454. Mir, R. Division Plane Orientation Defects Revealed by a Synthetic Double Mutant Phenotype / R. Mir, V.H. Morris, H. Buschmann, C.G. Rasmussen // *Plant Physiol.* – 2018. – V. 176(1). – P. 418-431. – doi: 10.1104/pp.17.01075.
455. Misra, R. C. Contribution to the embryology of *Arabidopsis thaliana* (Gay and Monn.) / R. C. Misra // *Agra Univ. J. Res. Sci.* – 1962. – V. 11. – P. 191–199.
456. Mistry, H. Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development / H. Mistry, B.A. Wilson, I.J. Roberts, C.J. O’Kane, J.B. Skeath // *Mech. Dev.* 2004. – V. 121. – P. 1495–1507.
457. Mitchell, P. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 30/50 exoribonucleases / P. Mitchell, E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, D. Tollervey // *Cell.* – 1997. – V. 91. – P. 457–466.
458. Mitchell, P. Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 30 processing of stable RNAs / P. Mitchell, E. Petfalski, R. Houalla, A. Podtelejnikov, M. Mann, D. Tollervey // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – V. 23. – P. 6982–6992.

459. Modilewski, J. Zur Embryobildung von einigen Onagraceen / J. Modilewski // Ber. Deutsch. Bot. Gesell. – 1909. – V. 27. – P. 287–291.
460. Molinier, J. Regulation and role of *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress / J. Molinier, E. Lechner, E. Dumbliauskas, P. Genschik // PLoS Genet. – 2008. – V. 4. – P. e1000093.
461. Moore, J. M. Isolation and characterization of gametophytic mutants in *Arabidopsis thaliana*: Ph.D. Thesis / Moore, J. M. – New York Stony Brook, USA: State University of New York at Stony Brook, USA. – 2002.
462. Moore, J. M. Genetic characterization of *hadad*, a mutant disrupting megagametogenesis in *Arabidopsis thaliana* / J. M. Moore, J.-P. Vielle-Calzada, W. Gagliano, U. Grossniklaus // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. -1997. – V. 62. – P. 35–47.
463. Morgulis A. WindowMasker: window-based masker for sequenced genomes / A. Morgulis, E.M. Gertz, A.A. Schäffer, R. Agarwala // Bioinformatics. – 2005. – V. 22. – P. 134-141. – DOI: 10.1093/bioinformatics/bti774
464. Motohashi, R. An essential role of a TatC homologue of a Delta pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* / R. Motohashi, N. Nagata, T. Ito, S. Takahashi, T. Hobo et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001. – V. 98. – P. 10499-10504.
465. Muller, H.J. Some genetic aspects of sex / H.J. Muller // Am Nat. – 1932. – V. 66. – P. 118–138.
466. Muller, H.J. The relation of recombination to mutational advance / H.J. Muller // Mut. Res. – 1964. – V. 106. – P. 2–9. – doi: 10.1016/0027-5107(64)90047-8
467. Murgia, M. Embryo sac lacking antipodal cells in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) / M. Murgia, B.-Q. Huang, S.C. Tucker, M.E. Musgrave // Am. J. Bot. – 1993. – V. 80. – P. 824–838.

468. Mutskov, V. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9 / V. Mutskov, G. Felsenfeld // *EMBO. J.* – 2004. – V. 23. – P. 138–149.
469. Naumova, T.N. Apomixis in Angiosperms: Nuclear and Integumentary Embryony / T.N. Naumova. – USA: CRC Press, 1993. – 152 pp. – <https://doi.org/10.1201/9781351069755>
470. Naumova, T.N. Apomixis and amphimixis in flowering plants / T.N. Naumova // *Cyt.Genetics.* – 2008. – V. 3. – P. 51-63. – DOI: 10.3103/S0095452708030055
471. Naumova, T. N. Reproductive development in apomictic populations of *Arabidopsis holboellii* (Brassicaceae) / T. N. Naumova, J. van der Laak, J. Osadtchiy, F. Matzk, A. Kravtchenko, J. Bergervoet, et al. // *Sex. Plant Reprod.* – 2001. – V. 14. – P. 195–200. – doi: 10.1007/s00497-001-0118-0
472. Nawaschin, S. G. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella* / S. G. Nawaschin // *Bul. Acad. Imp. Des Sci. St. Petersburg.* – 1898. – V. 9. – P. 377–382.
473. Neuteboom, L. W. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation / L. W. Neuteboom, J. M. Ng, M. Kuyper, O. R. Clijdesdale, P. J. Hooykaas, et al. // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 39. – P. 273–287.
474. Niessen, H.E. Talking to chromatin: post-translational modulation of Polycomb group function / H.E. Niessen, J.A. Demmers, J.W. Voncken // *Epigenetics Chromatin.* – 2009. – V. 2. – P. 10.
475. Nogler, G.A. “Gametophytic apomixis,” in *Embryology of Angiosperms* / G.A. Nogler – ed. B. Johri, Berlin: Springer, 1984a. – P. 475–518. – doi: 10.1007/978-3-642-69302-1_10
476. Nogler, G.A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion / G.A. Nogler // *Bot. Helv.* - 1984b. – V. 94. – P. 411–422. – doi: 10.1111/nph.12954

477. Ochkalova, S. First genome of rock lizard *Darevskia valentini* involved in formation of several parthenogenetic species / S. Ochkalova, V. Korchagin, A. Vergun, A. Urin, D. Zilov, S. Ryakhovskiy, A. Girnyk, I. Martirosyan, D.V. Zhernakova, M. Arakelyan, F. Danielyan, S. Kliver, V. Brukhin, A. Komissarov, A. Ryskov // *Genes* (Basel). – 2022. – V. 13(9). – P. 1569. – doi: 10.3390/genes13091569.
478. Ohad, N. A mutation that allows endosperm development without fertilization / N. Ohad, L. Margossian, Y.C. Hsu, C. Williams, P. Repetti, R.L. Fischer // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1996. – V. 93. – P. 5319–5324.
479. Ohad, N. Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization / N. Ohad, R. Yadegari, L. Margossian, M. Hannon; D. Michaeli, J.J. Harada, R.B. Goldberg, R.L. Fischer // *Plant Cell*. – 1999. – V. 11. – P. 407–416. – doi.org/10.1105/tpc.11.3.407.
480. Oh, S.-A. *halfman1*, an *Arabidopsis* male gametophytic mutant associated with a 150 kb chromosomal deletion at the site of transposon insertion / S.-A. Oh, S.-K. Park, I. Jang, J.M. Moore, U. Grossniklaus, D. Twell // *Sex. Plant Reprod.* – 2003. – V. 16. – P. 99-102.
481. Ohnston, A.J. Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte / A.J. Ohnston, P. Meier, J. Gheyselinck, S.E. Wuest, M. Federer, et al. // *Genome Biol.* – 2007. – V. 8. – P. 204-209.
482. Okada, T. Chromosomes carrying meiotic avoidance loci in three apomictic eudicot *Hieracium* subgenus *Pilosella* species share structural features with two monocot apomicts / T. Okada, K. Ito, S. D. Johnson, K. Oelkers, G. Suzuki, A. Houben, et al. // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 157. – P. 1327–1341. – doi: 10.1104/pp.111.181164
483. Olmedo-Monfil, V. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis* / V. Olmedo-Monfil, N. Durán-Figueroa, M. Arteaga-Vázquez, E. Demesa-Arévalo, D. Autran, D. Grimanelli, et al. // *Nature*. – 2010. – V. 464. – P. 628–632. – doi: 10.1038/nature08828

484. Ondov, B. D. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash / B. D. Ondov, T. J. Treangen, P. Melsted, A. B. Mallonee, N. H. Bergman, S. Koren, et al. // *Genome Biol.* – 2016. – V. 17. – P. 132. – doi: 10.1186/s13059-016-0997-x
485. Ono, A. Epigenetics and plant reproduction: Multiple steps for responsibly handling succession / A. Ono, T. Kinoshita // *Curr Opin Plant Biol.* – 2021. – V. 61. – P. 102032. – doi: 10.1016/j.pbi.2021.102032.
486. Ozias-Akins, P. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus* / P. Ozias-Akins, Y. Akiyama, W. W. Hanna // *Funct. Integr. Genomics.* – 2003. – V. 3. – P. 94–104. – doi: 10.1007/s10142-003-0084-8
487. Ortiz, J. P. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum* / J. P. Ortiz, C. L. Quarin, S. C. Pessino, C. Acuña, E. J. Martínez, F. Espinoza, et al. // *Ann. Bot.* – 2013. – V. 112. – P. 767–787. – doi: 10.1093/aob/mct152
488. Ou, C.Y. Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cull1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development / C.Y. Ou, Y.F. Lin, Y.J. Chen, C.T. Chien // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – P. 2403– 2414.
489. Ouyang, M. Liquid-Liquid Phase Transition Drives Intra-chloroplast Cargo Sorting / M. Ouyang, X. Li, J. Zhang, P. Feng, H. Pu, et al. // *Cell.* – 2020. – V. 180(6). – P. 1144-1159.e20. – doi: 10.1016/j.cell.2020.02.045. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32169217.
490. Page, D. R. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana* / D. R. Page, U. Grossniklaus // *Nature Rev Genet.* – 2002. – V. 3. – P. 124–36.
491. Page, D. R. Intrachromosomal excision of a hybrid *Ds* element induces large genomic deletions in *Arabidopsis* / D. R. Page, C. Köhler, J. A. da Costa -Nunes, C. Baroux, J. M. Moore, U. Grossniklaus // *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 2969–2974.
492. Pagnussat, G.C. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis* / G.C. Pagnussat,

- H.J. Yu, Q.A. Ngo, S. Rajani, S. Mayalagu, et al. // *Development*. – 2005. – V. 132(3). – P.603-614. – doi: 10.1242/dev.01595.
493. Palm, B. Studien über Konstruktionstypen und Entwicklungswege des Embryosackes der Angiospermen: Diss. – B. Palm. – Stockholm, 1915.
494. Papareddy, R.K. Chromatin regulates expression of small RNAs to help maintain transposon methylome homeostasis in *Arabidopsis* / R.K. Papareddy, K. Páldi, S. Paulraj, P. Kao, S. Lutzmayer, M.D. Nodine // *Genome Biol.* – 2020. – V. 21(1). – P. 251. – doi: 10.1186/s13059-020-02163-4.
495. Parinov, S. Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: A database for reverse genetics in *Arabidopsis* / S. Parinov, M. Sevugan, D. Ye, W.C. Yang, M. Kumaran, V. Sundaresan // *Plant Cell*. – 1999. – V. 11. – P. 2263–2270.
496. Park K. DNA demethylation is initiated in the central cells of *Arabidopsis* and rice / K. Park, M.Y. Kim, M. Vickers, J.S. Park, Y. Hyun, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – V. 113(52). – P.15138-15143. – doi: 10.1073/pnas.1619047114.
497. Parra, G. CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes / G. Parra, K. Bradnam, I. Korf // *Bioinformatics*. – 2007. – V. 23(9). – P. 1061-1067. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btm071.
498. Paszkowski, J. Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants / J. Paszkowski, U. Grossniklaus // *Curr Opin Plant Biol.* – 2011. – V. 14(2). – P. 195-203. – doi: 10.1016/j.pbi.2011.01.002.
499. Paten, B. Cactus: Algorithms for genome multiple sequence alignment / B. Paten, D. Earl, N. Nguyen, M. Diekhans, D. Zerbino, D. Haussler // *Genome Res*. – 2011. – V. 21(9). – P. 1512-28. – doi: 10.1101/gr.123356.111
500. Pefanis, E. RNA Exosome Regulates AID DNA Mutator Activity in the B Cell Genome / E. Pefanis, U. Basu // *Adv Immunol.* – 2015. – V. 127. – P. 257-308. – doi: 10.1016/bs.ai.2015.04.002.
501. Peng, W.T. A panoramic view of yeast noncoding RNA processing / W.T. Peng, M.D. Robinson, S. Mnaimneh, N.J. Krogan, G. Cagney, Q. Morris, A.P.

- Davierwala, J. Grigull, X. Yang, W. Zhang, et al. // *Cell*. – 2003. – V. 113. – P. 919–933.
502. Peters, J. M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy / J. M. Peters // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – V. 7. – P. 644–656. – doi: 10.1038/nrm1988
503. Phytozome v12.1 database [electronic resource]. – Access: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>
504. Picelli, S. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 / S. Picelli, O. Faridani, Å. Björklund, G. Winberg, S. Sagasser, R. Sandberg // *Nat. Prot.* – 2014. – V. 9. – P. 171–181. – doi: 10.1038/nprot.2014.006
505. Pickart, C.M. Back to the future with ubiquitin / C.M. Pickart // *Cell*. – 2004. – V. 116. – P. 181–190.
506. Pickett-Heaps, J. D. (1975). *Green Algae: Structure, Reproduction and Evolution in Selected Genera* / J. D. Pickett-Heaps– MA, USA: Sinauer, Sunderland, 1975.
507. Pien, S. Polycomb and trithorax group proteins in *Arabidopsis* / S. Pien, U. Grossniklaus // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – V. 1769. – P. 375–382.
508. Pikaard, C.S. Epigenetic regulation in plants / C.S. Pikaard, O. Mittelsten Scheid // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – V. 6(12). – P. a019315. – doi: 10.1101/cshperspect.a019315.
509. Pintard, L. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase / L. Pintard, J.H. Willis, A. Willems, et al. // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 311–316.
510. Pintard, L. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family / L. Pintard, A. Willems, M. Peter // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – P. 1681–1687.
511. Planchais, S. Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism / S. Planchais, A.K. Samland, J.A. Murray // *Plant J.* – 2004. – V. 38. – P. 616–625.

512. Podio, M. A methylation status analysis of the apomixis-specific region in *Paspalum spp.* suggests an epigenetic control of parthenogenesis / M. Podio, M.E. Cáceres, S.S. Samoluk, J.G. Seijo, S.C. Pessino, J.P. Ortiz, F. Pupilli // *J Exp Bot.* – 2014. – V. 65(22). – P. 6411-24. – doi: 10.1093/jxb/eru354.
513. Poethig, R.S. Cell lineage patterns in maize *Zea mays* embryogenesis a clonal analysis / R.S. Poethig, E.H.J. Coe, M.M. Johri // *Dev. Biol.* – 1986. – V. 117. – P. 392-404.
514. Potuschak, T. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2 / T. Potuschak, E. Lechner, Y. Parmentier, S. Yanagisawa, S. Grava, C. Koncz, P. Genschik // *Cell.* – 2003. – V. 115. – P. 679–689.
515. Pupilli, F. Cloning plants by seeds: Inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops / F. Pupilli, G. Barcaccia // *J. Biotechnol.* – 2012. – V. 159. – P. 291–311. – doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.028
516. Putman, A. I. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies / A. I. Putman, I. Carbone // *Ecol. Evol.* – 2014. – V. 4. – P. 4399–4428. – doi: 10.1002/ece3.1305.
517. Quinlan, A.R. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features / A.R. Quinlan, I.M. Hall // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – P. 841-842. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btq033
518. Ravi, M. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. / M. Ravi, M. P. Marimuthu, I. Siddiqi // *Nature.* – 2008. – V. 451. – P. 1121–1124. doi: 10.1038/nature06557
519. Ravi, M. Haploid Plants Produced by Centromere-Mediated Genome Elimination / Ravi M., Chan S.W.L. // *Nature.* – 2010. – V. 464. – P. 615–618.
520. Ravi, M. Meiosis-Specific Loading of the Centromere-Specific Histone *CENH3* in *Arabidopsis thaliana* / M. Ravi, F. Shibata, J.S. Ramahi, K. Nagaki, C. Chen, M. Murata, S.W.L. Chan // *PLoS Genet.* – 2011. – V. 7. – P. e1002121.

521. Redei, G. P. Non-Mendelian megagametogenesis in *Arabidopsis* / G. P. Redei // *Genetics*. – 1965. – V. 51. – P. 857–872.
522. Reed, S.I. Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover / S.I. Reed // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 4. – P. 855–864.
523. Rice, P. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite / P. Rice, I. Longden, A. Bleasby // *Trends Genet.* – 2000. – V. 16. – P. 276–277.
524. Rinehart, T.A. Comparative analysis of non-random DNA repair following *Ac* transposon excision in maize and *Arabidopsis* / T.A. Rinehart, C. Dean, C.F. Weil // *Plant J.* – 1997. – V. 12. – P. 1419–1427.
525. Rigaut, G. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration / G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, B. Seraphin // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 1030–1032. – doi: 10.1038/13732. PMID: 10504710.
526. Ríos, G. Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes / G. Ríos, A. Lossow, B. Hertel, F. Breuer, S. Schaefer, M. Broich, T. Kleinow, et al. // *Plant J.* – 2002. – V. 32. – P. 243–253.
527. Risseeuw, E.P. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis* / E.P. Risseeuw, T.E. Daskalchuk, T.W. Banks, E. Liu, J. Cotelesage, H. Hellmann, et al. // *Plant J.* – 2003. – V. 34. – P. 753–767.
528. Rodkiewicz, B. (1970). Callose in cell wall during megasporogenesis in angiosperms / B. Rodkiewicz // *Planta*. – 1970. – V. 93. – P. 39–47. – doi: 10.1007/BF00387650.
529. Rodriguez-Leal, D. Regulation of apomixis: learning from sexual experience / D. Rodriguez-Leal, J.-P. Vielle-Calzada // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15. – P. 549–555. – doi: 10.1016/j.pbi.2012.09.005.
530. Rodrigues-Pousada, R.A. The *Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1* is expressed during early development / R.A. Rodrigues-Pousada, R. De Rycke, A. Dedonder, W. van Caeneghem, G. Engler, M.V. van Montagu, D. van der Straeten // *Plant Cell*. – 1993. – V. 5. – P. 897–911.

531. Rojek, J. Establishing the cell biology of apomictic reproduction in diploid *Boechnera stricta* (Brassicaceae) / J. Rojek, M. Kapusta, M. Kozieradzka-Kiszkurno, D. Majcher, M. Górnjak, E. Sliwinska, et al. // *Ann. Bot.* – 2018. – V. 122. – P. 513–539. – doi: 10.1093/aob/mcy11
532. Roodbarkelari, F. Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreplication cycles in *Arabidopsis trichomes* / F. Roodbarkelari, J. Bramsiepe, C. Weinl, S. Marquardt, B. Novák, M.J. Jakoby, E. Lechner, P. Genschik, A. Schnittger // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – V. 107. – P. 15275–15280. – doi: 10.1073/pnas.1006941107.
533. Rossak, M. Expression of the *FAEI* gene and *FAEI* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana* / Rossak M., Smith M., Kunst L. // *Plant Mol Biol.* – 2001. – V. 46. – P. 717-725.
534. Rosso, M.G. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics / M.G. Rosso, Y. Li, N. Strizhov, B. Reiss, K. Dekker, B. Weisshaar // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 53. – P. 247–259. – doi: 10.1023/B:PLAN.0000009297.37235.4a. PMID: 14756321.
535. Roy, B. A. The breeding system of six species of *Arabis* (Brassicaceae) / Roy B. A. // *Am. J. Bot.* – 1995. – V. 82. – P. 869–877.
536. Ruggieri, R. MS11, a negative regulator of the RAS-cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae* / R. Ruggieri, K. Tanaka, M. Nakafuku, Y. Kaziro, A. Toh-e, K. Matsumoto // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1989. – V. 86. – P. 8778–8782. – doi: 10.1073/pnas.86.22.8778.
537. Rushworth, C. A. *Boechnera*, a model system for ecological genomics / C. A. Rushworth, B. H. Song, C. R. Lee, T. Mitchell-Olds // *Mol. Ecol.* – 2011. – V. 20. – P. 4843–4857. – doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05340.x
538. Rutishauser, A. Embryologie und Fortflanzungsbiologie der Angiospermen / A. Rutishauser. – Berlin etc.: Springer-Verlag, 1969. – 245 s.
539. Ryakhovsky, S.S. De novo transcriptome assembly and annotation of parthenogenetic lizard *Darevskia unisexualis* and its parental ancestors *Darevskia valentini* and *Darevskia raddei nairensis* / S.S. Ryakhovsky, V.A. Dikaya, V.I.

- Korchagin, A.A. Vergun, L.G. Danilov, S.D. Ochkalova, A.E. Girnyk, D.V. Zhernakova, M.S. Arakelyan, V.B. Brukhin, A.S. Komissarov, A.P. Ryskov // *Data Brief.* – 2021. – V. 39 P. 107685. – doi: 10.1016/j.dib.2021.107685.
540. Saeki, Y. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome / Y. Saeki, T. Sone, A. Toh-e, H. Yokosawa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 296. – P. 813–819. – doi: 10.1016/s0006-291x(02)02002-8. PMID: 12200120.
541. Sailer, C. Determination of the Developmental Origin of Seeds Containing Endosperm Using Flow Cytometric Analysis / C. Sailer, A. Schmidt, U. Grossniklaus // *Plos Genetics, BioProtocol.* – 2015. – V. 5. – P. 11. – DOI: 10.21769/BioProtoc.1484.
542. Saleme, M.L.S. The Role of Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) in Plant Reproduction / M.L.S. Saleme, I.R. Andrade, N.B. Eloy // *Front Plant Sci.* – 2021. – V. 12. – P. 642934. - doi: 10.3389/fpls.2021.642934.
543. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
544. Sanchez, J.P. Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals / J.P. Sanchez, N.H. Chua // *Plant Cell.* – 2001. – V. 13. – P. 1143-1154.
545. Sasaki, A. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant / A. Sasaki, H. Itoh, K. Gomi et al. // *Science.* – 2003. – V. 299. P. 1896–1898.
546. Savidan, Y. Chromosomal and embryological analyses in sexual X apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. / Y. Savidan // *Theor. Appl. Genet.* – 1980. – V. 57. – P. 153–156.
547. Savidan, Y. *Nature et Hérité De L'apomixie Chez Panicum maximum Jacq.* / Savidan Y. – Paris: Travaux et Documents ORSTOM, 1982.
548. Savidan, Y. “Apomixis: genetics and breeding” / Y. Savidan, in *Plant Breeding Reviews*, ed. J. Janick. – New York, NY: Wiley, 2000. – P. 13–86.

549. Savidan, Y. Apomixis, the next green revolution? / Y. Savidan; M. Dujardin – Recherche (France), 1992. – P. 326-334.
550. Schallau, A. Identification and genetic analysis of the *APOSPORY* locus in *Hypericum perforatum* L. / A. Schallau, F. Arzenton, A.J. Johnston, U. Hähnel, D. Koszegi, F.R. Blattner F.R., et al. // Plant J. – 2010. – V. 62(5). – P. 773-84. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04188.x.
551. Scheres, B. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials / B. Scheres, H. Wolkenfelt, V. Willemsen, M. Terlouw, E. Lawson, C. Dean, P. Weisbeek // Development. – 1994. – V. 120. – No. 9. – P. 2475-2487.
552. Scheuermann, J.C. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB / J.C. Scheuermann, A.G. de Ayala Alonso, K. Oktaba, N. Ly-Hartig, R.K. McGinty, S. Fraterman, M. Wilm, T.W. Muir, J. Müller // Nature. 2010. – V. 465. – P. 243–247.
553. Schilling, M. P. Admixture, evolution, and variation in reproductive isolation in the *Boechera puberula* clade / M. P. Schilling, Z. Gompert, F. W. Li, M. D. Windham, P. G. Wolf // BMC Evol. Biol. – 2018. – V. 18. – P. 61. – doi: 10.1186/s12862-018-1173-6
554. Schmidt, A. Controlling Apomixis: Shared Features and Distinct Characteristics of Gene Regulation / A. Schmidt // Genes (Basel). – 2020. – P. 11(3). – V. 329. – doi: 10.3390/genes11030329.
555. Schmidt, A. Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction / A. Schmidt, M. W. Schmid, U. Grossniklaus // Development. – 2015. – V. 142. – P. 229–241. – doi: 10.1242/dev.102103
556. Schmidt, A. Apomictic and sexual germline development differ with respect to cell cycle, transcriptional, hormonal and epigenetic regulation / A. Schmidt, M. W. Schmid, U. C. Klostermeier, W. Qi, D. Guthörl, C. Sailer, et al. // PLoS Genet. – 2014. – V. 10. – P. e1004476. – doi: 10.1371/journal.pgen.100447

557. Schmidt, M. W. (2012). A powerful method for transcriptional profiling of specific cell types in eukaryotes: laser-assisted microdissection and RNA sequencing / M. W. Schmidt, A. Schmidt, U. C. Klostermeier, M. Barann, P. Rosenstiel, U. Grossniklaus // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – P. e29685. – doi: 10.1371/journal.pone.0029685.
558. Schmidt, A. The Polycomb group protein MEDEA and the DNA methyltransferase MET1 interact to repress autonomous endosperm development in *Arabidopsis* / A. Schmidt, H.J. Wöhrmann, M.T. Raissig, J. Arand, J. Gheyselinck, V. Gagliardini, C. Heichinger, J. Walter, U. Grossniklaus // *Plant J*. – 2013. – V. 73(5). – P. 776-87. – doi: 10.1111/tpj.12070.
559. Schmidt, A. Transcriptome analysis of the *Arabidopsis* megaspore mother cell uncovers the importance of RNA helicases for plant germline development / A. Schmidt, S. E. Wuest, K. Vijverberg, C. Baroux, D. Kleen, U. Grossniklaus // *PLoS Biol*. – 2011. – V. 9. – P. e1001155. – doi: 10.1371/journal.pbio.1001155.
560. Schmitz, R.J. Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants / R.J. Schmitz, M.D. Schultz, M.G. Lewsey, R.C. O'Malley, M.A. Urich, O. Libiger, N.J. Schork, J.R. Ecker // *Science*. – 2011. – V. 334(6054). – P. 369-73. – doi: 10.1126/science.1212959.
561. Schneitz, K. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: A light microscope study of cleared whole-mount tissue / K. Schneitz, M. Hülskamp, R. E. Pruitt // *Plant J*. – 1995. – V. 7. – P. 731–749.
562. Schranz, M. E. Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechnera* (Brassicaceae) / Schranz M. E., Dobeš C., Koch M. A., Mitchell-Olds T. // *Am. J. Bot.* – 2005. – V. 92. – P. 1797–1810. – doi: 10.3732/ajb.92.11.179
563. Schranz, M.E. Asexual reproduction in a close relative of *Arabidopsis*: a genetic investigation of apomixis in *Boechnera* (Brassicaceae) / M.E. Schranz, L. Kantama, H. de Jong, T. Mitchell-Olds // *New Phytol.* – 2006a. – V. 171. – P. 425–438. – doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01765.x

564. Schranz, M.E. The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes / M.E. Schranz, M.A. Lysak, T. Mitchell-Olds // Trends Plant Sci. – 2006b. – V. 11(11). – P. 535-42. – doi: 10.1016/j.tplants.2006.09.002.
565. Schrick, K. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis / K. Schrick, U. Mayer, A. Horrichs, C. Kuhnt, C. Bellini, J. Dangl, J. Schmidt, G. Jürgens // Genes Dev. – 2000. – V. 14. – P. 1471–1484.
566. Schroeder, D.F. De-etiolated1 and damaged DNA binding protein1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis / D.F. Schroeder, M. Gahrtz, B.B. Maxwell, R.K. Cook, J.M. Kan, J.M. Alonso, J.R. Ecker, J. Chory // Curr Biol. – 2002. – V. 12. – P. 1462–1472.
567. Sharbel T. F. Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboellii* complex (Brassicaceae) / T. F. Sharbel, T. Mitchell-Olds // Heredity. – 2001. – V. 87. – P. 59–68. – doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00908.x
568. Sharbel, T. F. Biogeographic distribution of polyploidy and B chromosomes in the apomictic *Boechera holboellii* complex / T. F. Sharbel, T. Mitchell-Olds, C. Dobes, L. Kantama, H. de Jong // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – V. 109. – P. 283–292. – doi: 10.1159/000082411
569. Sharbel, T. F. Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns / T. F. Sharbel, M. L. Voigt, J. M. Corral, G. Galla, J. Kumlehn, C. Klukas, et al. // Plant Cell. – 2010. – V. 22. – P. 655–671. – doi: 10.1105/tpc.109.072223
570. Sharbel, T. F. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex / T. F. Sharbel, M. L. Voigt, J. M. Corral, T. Thiel, A. Varshney, J. Kumlehn, et al. // Plant J. – 2009. – V. 58. – P. 870–882. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03826.x.
571. Sharma, V. Counteracting role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in Alzheimer's disease / V. Sharma, A. Kaur, T.G. Singh // Biomed

- Pharmacother. – 2020. – V. 129. – P. 110373. – doi: 10.1016/j.biopha.2020.110373.
572. Shea, N. Three epigenetic information channels and their different roles in evolution / N. Shea, I. Pen, T. Uller // *J Evol Biol.* – 2011. – V. 24(6). – P. 1178–87. – doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02235.x.
573. Shen, W.I. Null mutation of *AtCUL1* causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis* / W.I. Shen, Y. Parmentier, H. Hellmann, E. Lechner, A. Dong, J. Masson, F. Granier, L. Lepiniec, M. Estelle, P. Genschik // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – V. 13. – P. 1916–1928.
574. Scott, R.J. Polyspermy in Apomictic *Crataegus*: Yes and No / Scott R.J. // *New Phytol.* – 2007. – V. 173. – P. 227–229.
575. Scott R.J.; Armstrong S.J.; Doughty J.; Spielman M. (2008). Double Fertilization in *Arabidopsis Thaliana* Involves a Polyspermy Block on the Egg but Not the Central Cell. *Mol. Plant* , 1, 611–619.
576. Simão, F.A. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs / F.A. Simão, R.M. Waterhouse, P. Ioannidis, E.V. Kriventseva, E.M. Zdobnov // *Bioinformatics.* – 2015. – V. 31. – P. 3210–3212. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btv351
577. Singer, J.D. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells / J.D. Singer, M. Gurian-West, B. Clurman, J.M. Roberts // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – P. 2375–2387.
578. Singh, M. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein / M. Singh, S. Goel, R.B. Meeley, C. Dantec, H. Parrinello, C. Michaud, O. Leblanc, D. Grimanelli // *Plant Cell.* – 2011. – V. 23(2). – P. 443–58. – doi: 10.1105/tpc.110.079020.
579. Slater, G.S. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison / G.S. Slater, E. Birney // *BMC Bioinformatics.* – 2005. – V. 6. – P. 31. – doi: 10.1186/1471-2105-6-31.
580. Slotkin, R.K. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen / R.K. Slotkin, M. Vaughn, F. Borges, M.

- Tanurdzić, J.D. Becker, J.A. Feijó, R.A. Martienssen // *Cell*. – 2009. – V. 136(3). – P. 461-72. – doi: 10.1016/j.cell.2008.12.038.
581. Smart, C. M. Gene expression during leaf senescence / C. M. Smart // *New Phytol.* – 1994. – V. 126. – P. 419-448.
582. Smalle, J. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12 / J. Smalle, J. Kurepa, P. Yang, E. Babiychuk, S. Kushnir, A. Durski, R.D. Vierstra // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 17–32.
583. Smalle, J. The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling / J. Smalle, J. Kurepa, P. Yang, T.J. Emborg, E. Babichuk, S. Kushnir, R.D. Vierstra // *Plant Cell*. – 2003. – V. 15. – P. 965–980.
584. Smalle, J. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol* / J. Smalle, R.D. Vierstra // *Plant Mol. Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 555–590.
585. Smetanin, D. Chromosome-level diploid genome assembly of apomictic *Boechnera* hybrid M4B [electronic resource] / D. Smetanin, U. Grossniklaus, V. Brukhin, T. Mandáková, E. Bakin, S. Nobre, A. Rueda. – 2022. – Access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/774175>
586. Smetanin, D. Hi-C assisted chromosome-level genome assembly of apomictic *Boechnera divaricarpa* ES517 [electronic resource] / D. Smetanin, U. Grossniklaus, V. Brukhin, T. Mandáková, E. Bakin, S. Nobre, A. Rueda. – 2022. – Access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA765627>
587. Smit, A.F.A. RepeatModeler Open-1.0 / [electronic resource] / A.F.A. Smit, R. Hubble. – 2008-2015. Access: <http://www.repeatmasker.org>
588. Smit A.F.A., Hubble R., Green P. RepeatMasker Open-4.0. <http://www.repeatmasker.org>
589. Soliman, M. Differential Epigenetic Marks Are Associated with Apospory Expressivity in Diploid Hybrids of *Paspalum rufum* / M. Soliman, M. Podio, G. Marconi, M. Di Marsico, J.P.A. Ortiz, E. Albertini, Delgado L. // *Plants (Basel)*. – 2021. – V. 10(4). – P. 793. – doi: 10.3390/plants10040793.

590. Soltis, D.E. *Tragopogon pratensis*: Multiple introductions to North America, circumscription, and the formation of the allotetraploid *T. miscellus* / D.E. Soltis, E.V. Mavrodiev, V. Brukhin, E. H. Roalson, D. C. Albach, G. T. Godden, Y. E. Alexeev, M. A. Gitzendanner, C. C. Freeman, J. Rocca, V. N. Suárez-Santiago, P. S. Soltis // TAXON. – 2023. – V. 72 (4). – P. 848-861. – DOI: 10.1002/tax.12936.
591. Song, B. H. High genetic diversity and population differentiation in *Boechea fecunda*, a rare relative of *Arabidopsis* / B. H. Song, T. Mitchell-Olds // Mol. Ecol. – 2007. – V. 19. – P. 4079–4088.
592. Song, B. Evolutionary and ecological genomics of non-model plants / B. Song, T. Mitchell-Olds // J. Syst. Evol. – 2011. – V. 49. – P. 17–24. – doi: 10.1111/j.1759-6831.2010.00111.x
593. Song, B. Multilocus patterns of nucleotide diversity, population structure and linkage disequilibrium in *Boechea stricta*, a wild relative of *Arabidopsis* / B. Song, A. J. Windsor, K. J. Schmid, S. Ramos-Onsins, M. E. Schranz, A. J. Heide, et al. // Genetics. – 2009. – V. 181. – P. 1021–1033. – doi: 10.1534/genetics.108.095364
594. Sonnhammer, E.L. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis / E.L. Sonnhammer, R. Durbin // Gene. – 1995. – V. 167. – P. 1–10.
595. Speranza, A. Inhibition of proteasome activity strongly affects kiwifruit pollen germination. Involvement of the ubiquitin/proteasome pathway as major regulator / A. Speranza, V. Scoccianti, R. Crinelli, G.L. Calzoni, M. Magnani // Plant Physiol. – 2001. – V.126. – P. 1150–1161.
596. Spielman, M. Genetic Mechanisms of Apomixis / M. Spielman, R. Vinkenoog, R.J. Scott // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003. – V. 358. – P. 1095–1103.
597. Spillane, C. Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields? / C. Spillane, M.D. Curtis, U. Grossniklaus // Nat. Biotechnol. – 2004. – V. 22(6). – P. 687-91.

598. Spillane, C. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds / C. Spillane, A. Steimer, U. Grossniklaus // *Sex. Plant Reprod.* – 2001. – V. 14. – P. 179–187. – doi: 10.1007/s00497-001-0117-111
599. Springer, P. S. Gene trap tagging of *prolifera*, an essential *Mcm2-3-5-like* gene in *Arabidopsis* / P. S. Springer, W. R. McCombie, V. Sundaresan, R. A. Martienssen // *Science.* – 1995. – V. 268. – P. 877–880.
600. Srayko, M. MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis / Srayko M., Buster D.W., Bazirgan O.A., McNally F.J., Mains, P.E. // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14. – P. 1072–1084.
601. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies / A. Stamatakis // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30(9). – P. 1312-3. – doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
602. Stanke, M. AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts / M. Stanke, O. Keller, I. Gunduz, A. Hayes, S. Waack, B. Morgenstern // *Nucl. Acids Res.* – 2006. – V. 34. – Suppl_2. – P. W435-W439. – DOI: 10.1093/nar/gkl200
603. Starostina, E. Cookiecutter: a tool for kmer-based read filtering and extraction / E., Starostina, G., Tamazian, P., Dobrynin, S., O'Brien, A. Komissarov // *bioRxiv.* – 2015. – V. 024679. – DOI: 10.1101/024679
604. Stebbins, G. L. Variation and Evolution in Plants / G. L. Stebbins – New York, NY: Columbia University Press, 1950. – 643 p.
605. Steffen, J.G. Identification of genes expressed in the *Arabidopsis* female gametophyte / J.G. Steffen, I.-H. Kang, J. MacFarlane, G.N. Drews // *Plant J.* 2007. – V. 5. – P. 1281-1292.
606. Stock, J.K. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells / J.K. Stock, S. Giadrossi, M. Casanova, E. Brookes, M. Vidal, H. Koseki, N. Brockdorff, A.G. Fisher, A. Pombo // *Nat Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 1428–1435.
607. Stolpe, T. In planta analysis of protein-protein interactions related to light signaling by bimolecular fluorescence complementation / T. Stolpe, C. Süsslin, K.

- Marrocco, P. Nick, T. Kretsch, S. Kircher // *Protoplasma*. – 2005. – V. 226. – P. 137–146.
608. Stoppin-Mellet, V. Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue / V. Stoppin-Mellet, J. Gaillard, M. Vantard // *Biochem. J.* – 2002. – V. 365. – P. 337–342.
609. Strassburger, E. Die Angiospermen und die Gymnospermen / E. Strassburger. – Jena, Germany: G. Fischer, 1879. – 267 s.
610. Sugasawa, K. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex / K. Sugasawa, Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, K. Tanaka, F. Hanaoka // *Cell*. – 2005. – V. 121. – P. 387–400.
611. Sundaresan, V. Patterns of gene-action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements / V. Sundaresan, P. Springer, T. Volpe, S. Haward, J. D. Jones, C. Dean, H. Ma, R. Martienssen // *Genes Dev.* – 1995. – V. 9. – P. 1797–1810.
612. Takahashi, H. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana* / H. Takahashi, A. Watanabe-Takahashi, F. W. Smith, M. Blake-Kalff, M. J. Hawkesford, K. Saito // *Plant J.* – 2000. – V. 23. – P. 171-182.
613. Talavera, G. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments / G. Talavera, J. Castresana // *Sys. Biol.* – 2007. – V. 56. – P. 564-577. – DOI: 10.1080/10635150701472164
614. Talbert, P.B. Histone Variants—Ancient Wrap Artists of the Epigenome / P.B. Talbert, S. Henikoff // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11. – P. 264–275. – doi: 10.1038/nrm2861.
615. Talent, N. Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from Maloid Rosaceae / N. Talent // *Theory Biosci.* – 2009. – V. 128. – P. 121–138. – doi: 10.1007/s12064-009-0061-4

616. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Mol. Biol. and Evol.* – 1993. – V. 10. – P. 512-526. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
617. Taşkin, K. M. (2015). Determination of the expression levels of DNA methyltransferase genes during a highly efficient regeneration system via shoot organogenesis in the diploid apomict *Boechera divaricarpa* / K. M. Taşkin, A. Özbilen, F. Sezer, N. Çördük, D. Erden // *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* – 2015. – V. 121. – P. 335–343. – doi: 10.1007/s11240-014-0704-0
618. Taşkin, K. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabis gunnisoniana* / K. M. Taşkin, K. Turgut, A. G. Ercan, R. J. Scott // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2003. – V. 72. – P. 173–179. – doi: 10.1023/A:1022291324492
619. Taşkin, K. M. Apomictic development in *Arabis gunnisoniana* / K. M. Taşkin, K. Turgut, R. J. Scott // *Israel J. Plant Sci.* – 2004. – V. 52. – P. 155–160. – doi: 10.1560/L3DE-FMVY-1XCQ-QRY5
620. Taşkin, K. M. Apomeiotic pollen mother cell development in the apomictic *Boechera* species / K. M. Taşkin, K. Turgut, R. J. Scott // *Biol. Plant.* – 2009a. – V. 53. – P. 468–474. – doi: 10.1007/s10535-009-0087-y
621. Taşkin, K. M. Somatic embryogenesis in apomictic *Boechera holboellii* / K. M. Taşkin, K. Turgut, R. J. Scott // *Acta Biol. Hungar.* - 2009b. – V. 60. – P. 301–307. – doi: 10.1556/ABiol.60.2009.3.7
622. Taw, M.N. Twin-arginine translocase component TatB performs folding quality control via a chaperone-like activity / M.N. Taw, J.T. Boock, B. Sotomayor, D. Kim, M.A. Rocco, D. Waraho-Zhmayev, M.P. DeLisa // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12(1). – P. 14862. – doi: 10.1038/s41598-022-18958-3.
623. Tchorzewska, D. Organelle layers at meiocyte of *Psilotum nudum* / D. Tchorzewska, V.B. Brukhin, J. Bednara // *Acta Soc. Bot. Pol.* – 1996. – V. 65. – № 1-2 – P. 91-96. – DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.1996.016>.

624. Tekel, S.J. Molecular structures guide the engineering of chromatin / S.J. Tekel, K.A. Haynes // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45(13). – P. 7555-7570. – doi: 10.1093/nar/gkx531.
625. Thoenissen G.H. 2001. Feeding the world in the 21 st century: plant breeding, biotechnology and the potential role of apomixis. The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering / G.H. Thoenissen; Y. Savidan, J.G. Carman, T. Dresselhaus eds., Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI, 2001. – P. 1-7.
626. Thomann, A. *Arabidopsis CUL3A* and *CUL3B* genes are essential for normal embryogenesis / A. Thomann, V. Brukhin, M. Dieterle, J. Gheyeselinck, U. Grossniklaus, P. Genschik // *The Plant Journal.* – 2005. – V. 43 (3). – P. 437-448.
627. Tiwari, V.K. PcG Proteins, DNA Methylation, and Gene Repression by Chromatin Looping / V.K. Tiwari, K.M. McGarvey, J.D.F. Licchesi, J.E. Ohm, J.G. Herman, D. Schübeler, S.B. Baylin // *PLoS Biol.* – 2008. – V. 6. – P. e306. – doi.org/10.1371/journal.pbio.0060306.
628. Torchet, C. Processing of 30-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs / C. Torchet, C. Bousquet-Antonelli, L. Milligan, E. Thompson, J. Kufel, D. Tollervey // *Mol. Cell.* – 2002. – V. 9. – P. 1285–1296.
629. Torres-Ruiz, R.A. The *GURKE* gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo / R.A. Torres-Ruiz, A. Lohner, G. Jürgens // *Plant J.* – 1996. – V. 10(6). – P. 1005-16. – doi: 10.1046/j.1365-313x.1996.10061005.x. PMID: 9011083.
630. Tricker, P.J. Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity / P.J. Tricker, C.M. López, G. Gibbings, P. Hadley, M.J. Wilkinson // *Int J Mol Sci.* – 2013. – V. 14(4). – P. 6674-89. – doi: 10.3390/ijms14046674.
631. Tzafrir, I. Diversity of *TITAN* functions in *Arabidopsis* seed development / I. Tzafrir, J.A. McElver, C.M. Liu, L.J. Yang, J.Q. Wu, A. Martinez, D.A. Patton, D.W. Meinke // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 128. – P. 38–51.

632. Ueda, M. The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems / Ueda M., Matsui K., Ishiguro S., Sano R., Wada T., Paponov I., Palme K., Okada K. // *Development*. – 2004. – V. 131. – P. 2101–2111.
633. Underwood, C.J. A *PARTHENOGENESIS* allele from apomictic dandelion can induce egg cell division without fertilization in lettuce / C.J. Underwood, K. Vijverberg, D. Rigola, S. Okamoto, C. Oplaat, R.H.M.O. den Camp, et al. // *Nat Genet*. – 2022. – V. 1. – P. 84-93. – doi: 10.1038/s41588-021-00984-y.
634. UniProt Consortium [electronic resource]. UniProt: the universal protein knowledgebase / UniProt Consortium // *Nucleic Acids Res*. – 2017. – V. 45. – P. D158-D169. – DOI: 10.1093/nar/gkw1099
635. UniProt Consortium [electronic resource]. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge / UniProt Consortium // *Nucleic Acids Res*. – 2019. – V. 47(D1). – P. D506-D515. – doi: 10.1093/nar/gky1049.
636. Vanacova, S. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control / S. Vanacova, J. Wolf, G. Martin, D. Blank, S. Dettwiler, A. Friedlein, H. Langen, G. Keith, W. Keller // *PLoS Biol*. – 2005. – V. 3. – P. e189. – doi: 10.1371/journal.pbio.0030189.
637. Vandepoele, K. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis* / K. Vandepoele, J. Raes, L. De Veylder, P. Rouze, S. Rombauts, D. Inze // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 903–916.
638. van Dijk, P.V. Apomixis: Basics for Non-botanists, in *Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis* / P.V. van Dijk. – eds I. Schön, K. Martens, P. van Dijk. – New York, NY: Springer, 2009. – P. 47–62.
639. van Dijk, P. The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal, in *Plant Species-Level Systematics: New Perspectives on Pattern and Process* / P. van Dijk, K. Vijverberg. – eds F. Bakker, L. Chatrou, B. Gravendeel, P. Pelsner – Ruggell: Gantner, 2005. – P. 101–116.
640. van Dijk, P. An apomixis-gene's view on dandelions, in *Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis* / P. van Dijk, H. de Jong, K. Vijverberg,

- A. Biere – eds I. Schön, K. Martens, P. van Dijk. – New York, NY: Springer, 2009. – P. 475–493.
641. van Dijk, P.J. Genetic Dissection of Apomixis in Dandelions Identifies a Dominant Parthenogenesis Locus and Highlights the Complexity of Autonomous Endosperm Formation / P.J. van Dijk, R. Op den Camp, S.E. Schauer // *Genes* (Basel). – 2020. – V. 11(9). – P. 961. – doi: 10.3390/genes11090961.
642. van der Auwera, G.A. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline / G.A. van der Auwera, M.O. Carneiro, C. Hartl, R. Poplin, G. del Angel, A. Levy-Moonshine, et al. // *Current Prot. Bioinformatics*. – 2013. – V. 11-10. – DOI: 10.1002/0471250953.bi1110s43
643. van der Merwe, J.A. Expression of mitochondrial *tatC* in *Nicotiana tabacum* is responsive to benzothiadiazole and salicylic acid / J.A. van der Merwe, I.A. Dubery // *J. Plant Physiol.* – 2007. – V. 164. – P. 1231-1234.
644. van Enckevort, L.J. EU-OSTID: a collection of transposon insertional mutants for functional genomics in rice / L.J. van Enckevort, G. Droc, P. Piffanelli, R. Greco, C. Gagneur // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – V. 59. – P. 99-110.
645. van Nocker, S. The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb 1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover / S. van Nocker, S. Sadis, D.M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley, R.D. Vierstra // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – V. 16. – P. 6020–6028.
646. Verhoeven, K.J. Epigenetic variation in asexually reproducing organisms / K.J. Verhoeven, V. Preite // *Evolution*. – 2014. – V. 68(3). – P.644-55. – doi: 10.1111/evo.12320.
647. Verma, R. Role of Rpn 11 metallo-proteinase in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome / R. Verma, L. Arvind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates, E.V. Koonin, R.J. Deshaies // *Science*. – 2002. – V. 298. – P. 611–615.
648. Victorian Bioinformatics Consortium. Barnap [electronic resource]. – 2017. – Access: <http://www.vicbioinformatics.com/software.barnap.shtml>

649. Vielle-Calzada, J.P. Apomixis - The asexual revolution / J.P. Vielle-Calzada, C.F. Crane, D.M. Stelly // *Science*. – 1996. – V. 274. – P. 1322-1323. – DOI: 10.1126/science.274.5291.1322.
650. Vielle-Calzada, J.P. Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis* *MEDEA* locus requires zygotic *DDMI* activity / J.P. Vielle-Calzada, J. Thomas, C. Spillane, A. Coluccio, M.A. Hoepfner, U. Grossniklaus // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – P. 2971–2982. – doi: 10.1101/gad.13.22.2971.
651. Vielle-Calzada, J. P. Reproductive versatility and the epigenetic control of female gametogenesis / J. P. Vielle-Calzada, E. Hernández-Lagana, D. Rodríguez-Leal, I. Rodríguez-Arévalo, G. León-Martínez, U. Abad-Vivero, et al. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 2012. – V. 77. – P. 17–21. – doi: 10.1101/sqb.2012.77.014894
652. Vierstra, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins / R.D. Vierstra // *Trends Plant Sci.* – 2003. – V. 68. – P. 135–142.
653. Vierstra, R.D. The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology / R.D. Vierstra // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – P. 385–397. doi: 10.1038/nrm2688
654. Vision, T.J. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis* / T.J. Vision, D.G. Brown, S.D. Tanksley // *Science*. – 2000. – V. 290. – P. 2114–2117.
655. Vodermaier, H.C. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle / H.C. Vodermaier // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – P. R787–R796.
656. Voges, D. The 26S proteasome: A molecular and machine designed for controlled proteolysis / D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – V. 68. – P. 1015–1068.
657. Voigt, M. L. Gametogenesis in the apomictic *Boechera holboellii* complex: the male perspective, in *Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives*. – M. L. Voigt, M. Melzer, T. Rutten, T. Mitchell-Olds, T. F. Sharbel; eds E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. J. van Dijk, T. F. Sharbel. – Rugell: A. R. G. Gantner Verlag, 2007. – 236–257.

658. Voigt-Zielinski, M.L. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera* / Voigt-Zielinski M.L., Piwczyński M., Sharbel, T.F. // *Sex. Plant Reprod.* – 2012. – V. 25. – P. 97–109. – doi: 10.1007/s00497-012-0181-8
659. Vurture, G.W. GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads / G.W. Vurture, F.J. Sedlazeck, M. Nattestad, C.J. Underwood, H. Fang, J. Gurtowski, et al. // *Bioinformatics.* – 2017. – V. 33. – P. 2202–2204. – doi: 10.1093/bioinformatics/btx153.
660. Waddington, C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters / Waddington C.H. // *Nature.* – 1942. – V. 150. – P. 563–565.
661. Waddington, C.H. The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology / C.H. Waddington, H. Kacser – London, UK: George Allen & Unwin, Ltd., 1957. – 262 p.
662. Walker, J. Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in *Arabidopsis* / J. Walker, H. Gao, J. Zhang, B. Aldridge, M. Vickers, J.D. Higgins, X. Feng // *Nat Genet.* – 2018. – V. 50(1). – P. 130-137. – doi: 10.1038/s41588-017-0008-5.
663. Wang, R. The *rin*, *nor*, and *Cnr* spontaneous mutations inhibit tomato fruit ripening in additive and epistatic manners / R. Wang, M. Lammers, Y. Tikunov, A.G. Bovy, G.C. Angenent, R.A. de Maagd // *Plant Sci.* – 2020. – V. 294. – P. 110436. – doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110436.
664. Wang, Z. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics / Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – V. 10. – P. 57–63. – doi: 10.1038/nrg2484
665. Wang, K.L. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein / K.L. Wang, H. Yoshida, C. Lurin, J.R. Ecker // *Nature.* – 2004. – V. 428. – P. 945–950.
666. Wang, H. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing / H. Wang, L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R.S. Jones, Y. Zhang // *Nature.* – 2004. – V. 431. – P. 873–878.

667. Wang, D. Partially redundant functions of two SET-domain Polycomb group proteins in controlling initiation of seed development in *Arabidopsis* / D. Wang, M.D. Tyson, S.S. Jackson, R. Yadegari // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006a. – V. 103. – P. 13244–13249.
668. Wang, H. Histone H3 and H4 ubiquitination by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage / H. Wang, L. Zhai, J. Xu, H.Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Xiong, Y. Zhang // Mol Cell. – 2006b. – V. 22. – P. 383–394.
669. Wardlaw, C.W. Embryogenesis in Plants / C.W. Wardlaw – London: Wiley, 1955. – 381 p.
670. Waterhouse, A.M. Jalview Version 2—A Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench / A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin, M. Clamp, G.J. Barton // Bioinformatics. – 2009. – V. 25. – P. 1189–1191.
671. Waterhouse, R.M. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics / R.M. Waterhouse, M. Seppey, F.A. Simão, M. Manni, P. Ioannidis, G. Klioutchnikov, E.M. Zdobnov // Mol. Biol. Evol. – 2018. – V. 35(3). – P. 543–548. – doi: 10.1093/molbev/msx319.
672. Webb M.C., Gunning B.E.S., Embryo sac development in *Arabidopsis* / Webb M.C., Gunning B.E.S. // Sex. Plant Rep. – 1990. – V. 3. – P. 244–256.
673. Webb, M.C. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. II. The cytoskeleton during megagametogenesis. / M.C., Webb, B.E.S. Gunning // Sex. Plant Reprod. – 1994. – V. 7. – P. 153–163.
674. Webb, M. Cell specification in the *Arabidopsis* root epidermis requires the activity of *ECTOPIC ROOT HAIR 3* – a katanin-p60 protein / M. Webb, S. Jouannic, J. Foreman, P. Linstead, L. Dolan // Development. – 2002. – V. 129. – P. 123–131.
675. Weber, H. *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZMATH protein family / H. Weber, A. Bernhardt, M. Dieterle, P. Hano, A. Mutlu, M. Estelle, P. Genschik, H. Hellmann // Plant Physiol. – 2005. – V. 137. – P. 83–93.

676. Weingartner, M. Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast / M. Weingartner, M.C. Criqui, T. Meszaros, P. Binarova, A.C. Schmit, A. Helfer, A. Derevier, M. Erhardt, L. Bogre, P. Genschik // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. 643–657.
677. Weisenfeld, N.I. Comprehensive variation discovery in single human genomes / N.I. Weisenfeld, S. Yin, T. Sharpe, B. Lau, R. Hegarty, L. Holmes, et al. // *Nat. Genetics*. – 2014. – V. 46. – P. 1350-1355. – DOI: 10.1038/ng.3121
678. Weissman, A.M. Themes and variations on ubiquitylation / A.M. Weissman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – V. 2. – P. 169–178.
679. Wertz, I.E. Diverse molecular provocation of programmed cell death / I.E. Wertz, M.R. Hanley // *Trends Biochem. Sci.* – 1996. – V. 21. – P. 359-364.
680. Whitlock, M. (2011). Gst and D do not replace fst / M. Whitlock / *Mol. Ecol.* – 2011. – V. 20. – P. 1083–1091. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04996.x
681. Willemsen, V. The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo / V. Willemsen, H. Wolkenfelt, G. de Vrieze, P. Weisbeek // *Development*. – 1998. – V. 125. – P. 521–531.
682. Wilkinson, C.R. The 26S proteasome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / C.R. Wilkinson, M. Penney, C. McGurk, M. Wallace, C. Gordon // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1999. – V. 354. – P. 1523–1532.
683. Wilkinson, C.R. Mts4, a non-ATPase subunit of the 26 S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2 / C.R. Wilkinson, M. Wallace, M. Seeger, W. Dubiel, C. Gordon // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 25768–25777.
684. Windham, M.D. New and noteworthy species of *Boechera* I: sexual diploids / M.D. Windham, I.A. Al-Shehbaz // *Harvard Pap. Bot.* – 2006. – V. 11. – P. 61-88. – DOI: 10.3100/1043-4534(2006)11[61:nansob]2.0.co;2
685. Windham, M.D. New and noteworthy species of *Boechera* (Brassicaceae) II: apomictic hybrids / M.D. Windham, I.A. Al-Shehbaz // *Harvard Pap. Bot.* –

- 2007a. – V. 11. – P. 257-274. – DOI: 10.3100/1043-4534(2007)11[257:nansob]2.0.co;2
686. Windham, M.D. New and noteworthy species of *Boechea* (Brassicaceae) III: additional sexual diploids and apomictic hybrids / M.D. Windham, I.A. Al-Shehbaz // Harvard Pap. Bot. – 2007b. – V. 12. – P. 235-257. – DOI: 10.3100/1043-4534(2007)12[235:nansob]2.0.co;2
687. Winkler, H. Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich / H. Winkler // Progressus Rei Botanicae. – 1908. – V. 2 (3). – P. 293–454.
688. Witte, C.P. Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope / C.P. Witte, L.D. Noel, J. Gielbert, J.E. Parker, T. Romeis // Plant Mol Biol. – 2004. – V. 55. – P. 135- 147.
689. Woffender, B.J. Proteasome inhibitors prevent tracheary element differentiation in zinnia mesophyll cellculture / B.J. Woffender, T.B. Freeman, E.P. Beers // Plant Physiol. – 1998. – V. 118. – P. 419-430.
690. Wuest, S.E. *Arabidopsis* female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes / S.E. Wuest, K. Vijverberg, A. Schmidt, M. Weiss, J. Gheyselinck, M. Lohr, F. Wellmer, J. Rahnenführer, C. Von Mering, U. Grossniklaus // Curr. Biol. – 2010. – V. 20. – P. 506- 512.
691. Wyers, F. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase / F. Wyers, M. Rougemaille, G. Badis, J.C. Rousselle, M.E. Dufour, J. Boulay, B. Regnault, F. Devaux, A. Namane, B. Seraphin, et al. // Cell. – 2005. – V. 121. – P. 725–737. – doi: 10.1016/j.cell.2005.04.030.
692. Xie, Z. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants / Z. Xie, L.K. Johansen, A.M. Gustafson, K.D. Kasschau, A.D. Lellis, D. Zilberman, S.E. Jacobsen, J.C. Carrington // PLoS Biol. – 2004. – V. 2. – P. E104. – doi: 10.1371/journal.pbio.0020104.
693. Xie, T. De novo plant genome assembly based on chromatin interactions: a case study of *Arabidopsis thaliana* / T. Xie, J.F. Zheng, S. Liu, C. Peng, Y.M. Zhou,

- Q.Y. Yang, H.Y. Zhang // *Mol Plant*. – 2015. – V. 8(3). – P. 489-92. – doi: 10.1016/j.molp.2014.12.015.
694. Xu, L. The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis* / L. Xu, F. Liu, E. Lechner, P. Genschik, W.L. Crosby, H. Ma, W. Peng, D. Huang, D. Xie // *Plant Cell*. 2002. – V. 14. – P. 1919–1935.
695. Xu, L. Polycomb silencing of *KNOX* genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis* / L. Xu, W.H. Shen // *Curr Biol*. – 2008. – V. 18. – P. 1966–1971.
696. Xu, J. *Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development / Xu J., Yang J.Y., Niu Q.W., Chua, N.H. // *Plant Cell*. – 2006. – V. 18. – P. 3386–3398.
697. Xu, L. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. / L. Xu, Y. Wei, J. Reboul, P. Vaglio, T.H. Shin, M. Vidal, S.J. Elledge, J.W. Harper // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 316–321.
698. Yadegari, R. Female gametophyte development / R. Yadegari, G.N. Drews // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. S133–141.
699. Yadegari, R. Cell-differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis raspberry* embryos / R. Yadegari, G. Pavia, T. Laux, A.M. Koltunow, N. Apuya, J.L. Zimmerman, R.L. Fischer, J.J. Harada, R.B. Goldberg // *Plant Cell*. – 1994. – V. 6. – P. 1713–1729.
700. Yamada, K. Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome / K. Yamada, J. Lim, J.M. Dale, H. Chen, P. Shinn, C.J. Palm, A.M. Southwick, H.C. Wu, C. Kim, M. Nguyen, et al. // *Science*. – 2003. – V. 302. – P. 842–846.
701. Yang, P. Purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms / P. Yang, H. Fu, J. Walker, C.M. Papa, J. Smalle, et al. // *J. Biol. Chem*. – 2004. – V. 279. – P. 6401–6413.

702. Yen, M.R. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system / M.R. Yen, Y.H. Tseng, E.H. Nguyen, L.F. Wu, M.H. Saier Jr // *Arch. of Microbiol.* – 2002. – V. 177. – P. 441-450.
703. You, J.X. A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains / J.X. You, C.M. Pickart // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 19871–19878.
704. Yu, C.-S. Prediction of Protein Subcellular Localization / C.-S. Yu, Y.-C. Chen, C.-H. Lu, J.-K. Hwang // *Proteins.* – 2006. – V. 64. – P. 643–651.
705. Yu, H.J. Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression profiling / H.J. Yu, P. Hogan, V. Sundaresan // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139. – P. 1853-1869.
706. Zappacosta, D.C. Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid / Zappacosta D.C., Ochogavía A.C., Rodrigo J.M., Romero J.R., Meier M.S., Garbus I., Pessino S.C., Echenique V.C. // *Sci Rep.* – 2014. – V. 4. – P. 4423. – doi: 10.1038/srep04423.
707. Zhang, S. Resources for targeted and deletional mutagenesis in *Arabidopsis* / S. Zhang, S. Raina, H. Li, J. Li, E. Dec, H. Ma, H. Huang, N.V. Federoff // *Plant Molec. Biol.* – 2003. – V. 53. – P. 133-150.
708. Zhang, X. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* / X. Zhang, J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S.W. Chan, H. Chen, I.R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen, J.R. Ecker // *Cell.* – 2006. – V. 126. – P. 1189–1201.
709. Zhao, D. Conservation and divergence of *ASK1* and *ASK2* gene functions during male meiosis in *Arabidopsis thaliana* / D. Zhao, T. Han, E. Risseuw, W.L. Crosby, H. Ma // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 53. – P. 163–173.
710. Zhou, M. RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules / M. Zhou, J.A. Law // *Curr Opin Plant Biol.* – 2015. – V. 27. – P. 154-64. – doi: 10.1016/j.pbi.2015.07.005.
711. Zhou W., Zhu P., Wang J., Pascual G., Ohgi K.A., Lozach J., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription

- by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation / Zhou W., Zhu P., Wang J., Pascual G., Ohgi K.A., Lozach J., Glass C.K., Rosenfeld M.G. // *Mol Cell*. – 2008. – V. 29. – P. 69–80.
712. Zilberman, D. Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA- directed DNA methylation triggered by inverted repeats / D. Zilberman, X. Cao, L.K. Johansen, Z. Xie, J.C. Carrington, S.E. Jacobsen // *Curr. Biol*. – 2004. – V. 14. – P. 1214–1220.
713. Zuo, J. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants / J. Zuo, Q.W. Niu, N.H. Chua // *Plant J*. – 2000. – V. 24. – P. 265–273.
714. Zybailov, B. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome / B. Zybailov, H. Rutschow, G. Friso, A. Rudella, O. Emanuelsson, Q. Sun, K. J. Van Wijk // *PLoS ONE*. – 2008. – V. 3(4). – P. 1994.