

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

УДК 57.023

На правах рукописи

НЕЖДАНОВА АННА ВЛАДИМИРОВНА

Эффекты гетерологичной экспрессии генов транскрипционных факторов (*MADS-box*, *YABBY*) и редактирования генов метаболизма (*PHO1a*, *PDS*) на особенности регуляции онтогенеза *Nicotiana tabacum* и *Solanum tuberosum*

Специальность: 1.5.6. – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Щенникова Анна Владимировна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР | 11 |
| 1.1. Высшие растения: аспекты развития..... | 11 |
| 1.2. Высшие растения: эволюция, доместикация, селекция..... | 13 |
| 1.2.1. Между генотипом и фенотипом | 15 |
| 1.2.2. Генетическая основа параллельной эволюции: время цветения как пример..... | 16 |
| 1.2.3. Транскрипционные факторы как мишени при искусственном отборе растений ... | 17 |
| 1.3. MADS-доменные ТФ как главные регуляторы развития растений и ценных признаков отбора..... | 17 |
| 1.3.1. <i>MADS-box</i> гены и вернализация..... | 18 |
| 1.3.2. <i>MADS-box</i> гены и архитектура соцветия | 20 |
| 1.3.3. <i>MADS-box</i> гены и признаки урожайности | 21 |
| 1.3.4. Мультифункциональность <i>MADS-box</i> генов | 23 |
| 1.3.5. Характеристика семейства <i>MADS-box</i> генов | 24 |
| 1.3.6. <i>MADS-box</i> гены и длительность стадий онтогенеза растения | 25 |
| 1.3.7. <i>MADS-box</i> гены и вегетативное развитие растения | 26 |
| 1.3.8. <i>MADS-box</i> гены и репродуктивное развитие растения..... | 27 |
| 1.3.9. <i>MADS-box</i> гены и образование семян..... | 30 |
| 1.3.10. Гены <i>MADS-box</i> МІККС ^С -типа и возникновение семян и цветков..... | 32 |
| 1.3.11. Механизмы действия MADS-доменных ТФ..... | 32 |
| 1.3.12. В заключение к главе 1.3 | 33 |
| 1.4. Семейство ТФ YABBY: эволюция и развитие растений..... | 34 |
| 1.4.1. ТФ YABBY и адаксиально-абаксиальная полярность органов..... | 35 |
| 1.4.2. В заключение к главе 1.4 | 37 |
| 1.5. MADS- и YABBY-доменные ТФ в ответе растений на стрессовые факторы | 38 |
| 1.5.1. MADS-доменные ТФ в стрессовом ответе | 38 |
| 1.5.2. Участие ТФ YABBY в реакции на фитогормоны и стрессовые факторы | 45 |
| 1.6. Селекция растений и современные методы генной инженерии | 46 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 48 |
| 2.1. Растения, штаммы, вектора | 48 |
| 2.1.1. Растения | 48 |
| 2.1.2. Штаммы | 49 |
| 2.1.3. Вектора..... | 49 |
| 2.2 Растворы и среды..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 2.3. Компетентные клетки <i>E. coli</i> | 52 |
| 2.4. Компетентные клетки агробактерии..... | 53 |
| 2.5. Агробактериальная трансформация табака <i>N. tabacum</i> | 53 |
| 2.6. Агробактериальная трансформация картофеля <i>S. tuberosum</i> | 54 |
| 2.7. Трансформация дрожжевого штамма..... | 55 |
| 2.8. Экстракция геномной ДНК..... | 55 |
| 2.9. Использование стандартных наборов для молекулярно-генетических и биохимических работ..... | 56 |
| 2.10. Использование метода ПЦР | 56 |
| 2.11. Определение экспрессии гена | 57 |
| 2.12. Фенотипический анализ растений | 57 |
| 2.13. Имитация холодового стресса при выращивании модифицированных растений табака и картофеля | 57 |
| 2.14. Анализ содержания каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов | 58 |
| 2.15. Статистический анализ данных..... | 58 |
| 2.16. Биоинформационный анализ | 58 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 60 |
| 3.1. Структурно-функциональный анализ генов семейства <i>YABBY</i> клады <i>FIL</i> подбельника и хризантемы..... | 60 |
| 3.1.1. Структура и филогения ТФ семейства <i>YABBY</i> | 60 |
| 3.1.2. Функция генов <i>MhyFIL1</i> , <i>MhyFIL3</i> и <i>CDM51</i> | 63 |
| 3.2. Сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> генов в растениях табака <i>N. tabacum</i> изменяет идентичность репродуктивных органов и время инициации цветения | 66 |
| 3.2.1. Филогенетический анализ <i>MADS</i> - <i>box</i> генов | 66 |
| 3.2.2. Получение трансгенных растений табака с эктопической конститутивной экспрессией гетерологичных <i>MADS</i> - <i>box</i> генов..... | 71 |
| 3.2.3. Анализ роли <i>MADS</i> - <i>box</i> гена <i>SIMADS5</i> в развитии томата <i>S. lycopersicum</i> | 71 |
| 3.2.4. Сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> гена <i>CDM44</i> в растении табака | 76 |
| 3.2.5. Совместная сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> генов <i>HAM45</i> и <i>HAM59</i> в растении табака 77 | 77 |
| 3.2.6. Сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> гена <i>CDM37</i> в растении табака | 79 |
| 3.2.7. Совместная сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> генов <i>CDM44</i> , <i>HAM45</i> и <i>HAM59</i> в растениях табака | 81 |
| 3.2.8. Индивидуальная и одновременная сверхэкспрессия <i>MADS</i> - <i>box</i> генов <i>CDM86</i> и <i>CDM115</i> в растениях табака..... | 82 |
| 3.2.9. Одновременная сверхэкспрессия трёх <i>MADS</i> - <i>box</i> генов <i>CDM37</i> , <i>CDM86</i> и <i>CDM115</i> в растениях табака | 86 |

| | |
|--|-----|
| 3.3 Участие <i>MADS-box</i> генов в стрессовых реакциях растений | 89 |
| 3.3.1. Экспрессия <i>MADS-box</i> генов в трансгенных растениях картофеля <i>S. tuberosum</i> с измененным метаболизмом крахмала за счет внесения мутации в последовательность гена пластидной крахмалфосфорилазы <i>PHO1a</i> | 89 |
| 3.3.2. Экспрессия <i>MADS-box</i> генов в трансгенных растениях табака <i>N. tabacum</i> с измененным метаболизмом крахмала за счет неполного нокаута гена пластидной крахмалфосфорилазы <i>NtPHO1-L1</i> | 96 |
| 3.3.3. Экспрессия <i>MADS-box</i> генов в трансгенных растениях табака <i>N. tabacum</i> с измененным метаболизмом каротиноидов за счет неполного нокаута гена фитоиндесатуразы <i>NtPDS</i> | 102 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 108 |
| ВЫВОДЫ..... | 110 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 111 |
| Приложение | 132 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Царство растений в современном мире объединяет более 300 тысяч видов, большую часть которых составляют высшие цветковые растения. Такое огромное разнообразие является следствием эволюционных преобразований растений-предшественников в процессе естественного отбора. Искусственный отбор (доместикация) способствовал тому, что отдельные, полезные для человека виды дали начало современным сельскохозяйственным культурам. При этом отбор велся как по ценным качественным признакам (напр., урожайность или стрессоустойчивость), так и на предмет адаптации к различным условиям выращивания (Purugganan, 2019). В настоящее время в мире насчитывается от 1 до 2,5 тыс. видов доместицированных растений, которые выращиваются в различных регионах мира (Milla et al., 2018).

Возможные механизмы доместикации активно изучаются с использованием современных подходов и методов молекулярной генетики, эволюции и археоботаники (Purugganan, 2019), и получаемые данные успешно используются в селекции агрокультур. Сегодня считается, что период от приобретения морфологических изменений до их закрепления занимал около 2-3 тыс. лет (Purugganan, 2019; Smith et al., 2019). Данный процесс сцеплен с явлением дупликации и диверсификации генов. Многие гены были охарактеризованы как возможные мишени доместикации, и особенное место среди них принадлежит генам транскрипционных факторов (ТФ). ТФ способны регулировать экспрессию множества генов различных путей развития, вариабельность активности которых влияет на проявление целого ряда признаков (Schilling et al., 2018; Theißen et al., 2018). С эволюцией генов ТФ у растений связывают возникновение специализированных тканей и органов и разнообразие их форм (Schilling et al., 2018).

К примеру, с семейством генов *YABBY*-доменных ТФ ассоциируют появление и многообразие листьев (Eckardt, 2010). Другим ярким примером ТФ как мишеней доместикации является семейство *MADS*-доменных белков, принимающих жизненно важное участие во всех аспектах онтогенеза растений. Предполагается, что именно эволюция семейства *MADS*-доменных ТФ привела к появлению цветковых растений и их огромному разнообразию (Smaczniak et al., 2012; Schilling et al., 2018; Theißen et al., 2018; Castelán-Muñoz et al., 2019). Многочисленность осуществляемых *MADS*-доменными ТФ функций, а также их консерватизм между разными видами растений открывают широкие перспективы использования генов *MADS-box* в селекции агрокультур (Soyk et al., 2017; Schilling et al., 2018).

При изменении активности генов *YABBY* или *MADS-box* меняется архитектура и другие характеристики (например, длительность фенотаз) растений. В случае агрокультур это вносит

значительные коррективы в проявление хозяйственно ценных признаков. Это подчеркивает актуальность и значимость сравнительных структурно-функциональных исследований генов *YABBY* и *MADS-box*, как межвидовых, так и внутривидовых (например, образцы разного происхождения у дикорастущих видов или гибриды, сорта и линии у агрокультур). Получаемые в процессе исследований данные могут быть использованы в селекционных программах, направленных на улучшение хозяйственно ценных признаков у конкретных культур. Помимо практического значения, исследования семейств генов *YABBY* и *MADS-box* способствуют увеличению объема знаний об эволюции и онтогенезе растений.

Степень разработанности

В 1989 году вышла первая публикация по характеристике гомеотических мутаций в цветке *Arabidopsis thaliana* (Bowman et al., 1989). Уже в 1991 году данные мутации были ассоциированы с *MADS-box* генами, на основе чего была предложена ABC-модель развития цветка (Meyerowitz et al., 1991), которая позднее была дополнена до модели ABC(E) (Ma et al., 1991). Дальнейшие исследования привели к появлению модели Квартет (Theißen and Saedler, 2001; Nonna and Goto, 2001). В совокупности, модели ABC(E) и Квартет постулируют наличие генетических активностей А, В, С и Е, разные сочетания которых определяют идентичность цветковых органов. За каждую активность отвечают гены семейства *MADS-box*, функционирующие в составе тетрамерных комплексов (Nonna and Goto, 2001). Был охарактеризован возможный вклад *MADS-box* транскрипционных факторов в эволюцию, domestикацию и стрессовый ответ растений (Schilling et al., 2018; Theißen et al., 2018; Castelán-Muñoz et al., 2019). Кроме того, было показано, что помимо роли в развитии цветка, *MADS-box* транскрипционные факторы участвуют практически во всех процессах онтогенеза растения (Smaczniak et al., 2012).

Первые работы, характеризующие гены семейства *YABBY*, появились в конце 1990-х годов (Bowman and Smyth, 1999). В последующие годы показана значимость транскрипционных факторов семейства *YABBY* для эволюции, онтогенеза (Bartholmes et al., 2012), селекции (Zhang et al., 2020a) и стрессовой реакции (Hou et al., 2019) растений.

В нашей лаборатории были идентифицированы и частично охарактеризованы семейства генов *MADS-box* хризантемы и подсолнечника (Шульга и др., 2008, 2015; Shchennikova et al., 2004; Сизенева и др., 2013; Щенникова и др., 2003, 2011), а также семейство генов *YABBY* подбельника (Shchennikova et al., 2018) и *YABBY*-ген хризантемы *CDM51* (не опубликовано).

В настоящей диссертационной работе в качестве объектов исследования были использованы гены *MADS-box* и *YABBY* различных видов растений (сем Пасленовые, Астровые, Вересковые).

Цель исследования

Целью исследования стала функциональная характеристика целевых генов семейств *YABBY* и *MADS-box*.

Задачи исследования

Для этого были определены следующие задачи:

1. Провести структурно-филогенетический анализ семейств генов *YABBY* и *MADS-box* у исследуемых видов растений.
2. Определить целевые гены *YABBY* и *MADS-box* для исследования и провести их функциональный анализ с использованием генно-инженерного подхода: путем получения трансгенных растений табака со сверхэкспрессией этих генов.
3. Провести анализ возможного участия *MADS-box* генов в адаптационной реакции трансгенных растений табака и картофеля на нарушение углеводного обмена или биосинтеза каротиноидов/фитогормонов.

Научная новизна и практическая значимость

Получены и охарактеризованы трансгенные растения табака с индивидуальной и/или совместной сверхэкспрессией: *YABBY*-генов (*MhyFIL1*, *MhyFIL3* и *CDM51*) подъяельника и хризантемы; *MADS-box* генов хризантемы (*CDM44*, *CDM37*, *CDM86* и *CDM115*), томата (*SIMADS5*) и подсолнечника (*HAM45* и *HAM59*). Определена возможная роль исследуемых *YABBY*-генов в асимметричном развитии листьев и апикальной меристемы побега, и целевых *MADS-box* генов в спецификации органов цветка. Определена дифференциальная экспрессия генов *MADS-box* в ответ на изменение метаболизма крахмала и каротиноидов у полученных трансгенных растений картофеля и табака с редактированной последовательностью гена крахмалфосфорилазы *PHO1a* или гена фитоиндесатуразы *PDS*.

Полученные результаты практически значимы, поскольку гены *YABBY* и *MADS-box* определяют многие хозяйственно ценные признаки сельскохозяйственных культур, включая сроки цветения и созревания, урожайность, качество плодов и семян, стрессоустойчивость. Данные об аллельной вариабельности и/или дифференциальной экспрессии *YABBY* и *MADS-box* генов между сортами и линиями одной культуры могут быть использованы для поиска доноров целевых признаков в селекции улучшенных сортов.

Методология и методы исследования

Для решения задач использовались биоинформационные, молекулярно-биологические, генно-инженерные и биохимические методы и подходы.

В работе были использованы штаммы *E. coli* XL1, *A. tumefaciens* AGL0 и *S. cerevisiae* Pj69-4a, растения *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* и *Monotropa hypopitys*, и плазмидные вектора pGD121 (сверхэкспрессия в растении), p201N (CRISPR/Cas9-редактирование), pGEMT-easy (промежуточное клонирование), pAD-GAL4 и pBDCam-GAL4 (анализ белок-белковых взаимодействий). Получение генетических конструкций осуществляли стандартными методами клонирования. Анализ белок-белковых взаимодействий проводили в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе, согласно стандартному протоколу. Для получения трансгенных растений со сверхэкспрессией трансгена или с конструкцией для CRISPR-Cas9-редактирования использовали агробактериальную трансформацию. Для получения препаратов нуклеиновых кислот, проведения ПЦР, ПЦР-РВ (анализ экспрессии гена) и биохимического анализа (содержание крахмала, каротиноидов, хлорофиллов, антоцианов) использовали стандартные наборы и методы. Для анализа данных использовали пакеты программ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>), а также программы MEME 5.5.4 ('motif discovery': <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>), Clone Manager (<https://ru.freownloadmanager.org/Windows-PC/Clone-Manager.html>) и Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>). Подробно методология и методы исследования изложены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Положения, выносимые на защиту:

1. *YABBY*-гены *MhyFIL1*, *MhyFIL3* (подбельник) и *CDM51* (хризантема) входят в *YABBY*-подсемейство *FILAMENTOUS FLOWER* и участвуют в асимметричном развитии листьев и апикальной меристемы побега.
2. *MADS-box* гены *SIMADS5* (томат) и *CDM44* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *SEPALLATA3* и могут участвовать в спецификации лепестков и генеративных органов.
3. *MADS-box* гены *HAM45*, *HAM59* (подсолнечник) и *CDM37* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *AGAMOUS* и связаны с контролем идентичности цветковой меристемы и генеративных органов.
4. *MADS-box* гены *CDM86* и *CDM115* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *PISTILLATA/APETALA3* и могут участвовать в спецификации лепестков и тычинок.
5. *MADS-box* гены подсемейств *SEPALLATA* и *FRUITFULL* могут участвовать в регуляции стрессового ответа растений.

Степень достоверности и апробация результатов

Все результаты были получены впервые (подчеркивает новизну исследования), лично или при непосредственном участии диссертанта, достоверны и представлены более чем на 14 всероссийских и международных конференциях (школах, конгрессах).

Результаты работы представлены на конференциях, форумах, съездах и конгрессах: XIX Конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (15–16 апреля 2019, Москва); XI-я Международная научно-практическая конференция, приуроченная к 60-летию со дня образования РУДН «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» (25-27 апреля 2019, Москва); VII-X международные научно-практические конференции «Биотехнология: наука и практика» (16-20 сентября 2019, Севастополь; 22-26 сентября 2020 Ялта; 20-24 сентября 2021, Ялта; 12-16 сентября 2022, Алушта); Международные форумы «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (27-29 мая 2020, 26-29 октября 2021, 31 октября-1 ноября 2022, Москва); The 6th International Scientific Conference «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021)» (14-18 июня 2021, Новосибирск); 45th FEBS Congress (3-8 июля, 2021, Ljubljana, Slovenia); 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (9-13 апреля, 2023); X Съезд Общества физиологов растений России (18-23 сентября 2023, Уфа); Конгресс «CRISPR-2023» (11-13 сентября 2023, Новосибирск); XXIV Конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (23–27 сентября 2024, Москва).

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, соответствующих для поставленных задач методов исследования и методов обработки данных.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных публикаций, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа (154 стр.) состоит из введения, тематического обзора литературы, раздела Материалы и методы, описания и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы (255 источников), и включает 62 рисунка, а также 19 таблиц, вынесенных в Приложение.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология, а именно областям исследований: биотехнология растительных и животных

клеток, создание генетически модифицированных организмов растительного, животного и микробного происхождения (ГМО и ГММ) на основе направленного редактирования геномов и синтетической биологии; биотехнологии клеточных культур.

Личный вклад

Результаты получены соискателем лично или при его непосредственном участии. Все технические действия согласно методам, представленным в настоящей работе, выполнялись непосредственно автором. Анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в подготовке к публикации в научных изданиях статей и тезисов по материалам диссертационной работы.

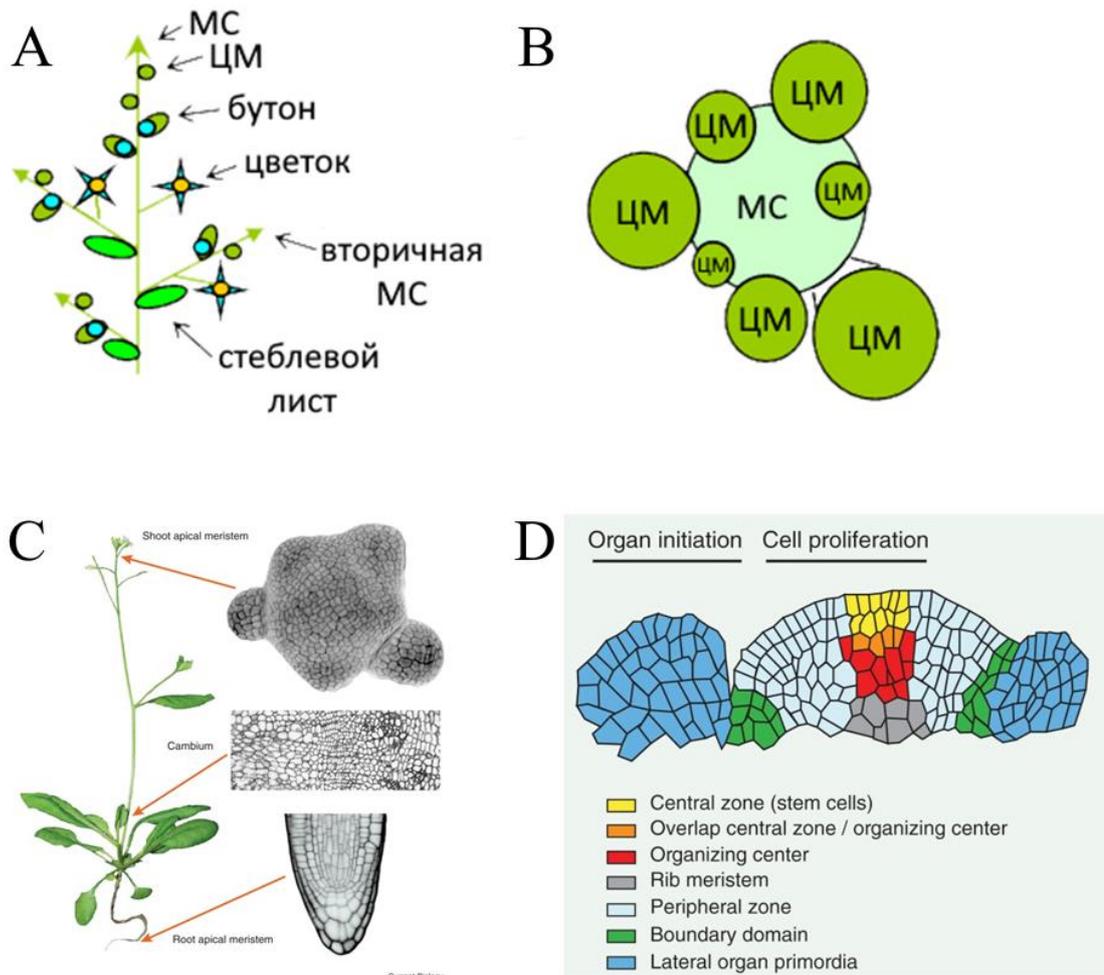
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Высшие растения: аспекты развития

Среди живых организмов на Земле самым большим царством считается царство растений. Всего известно около 390900 видов растений, которые отличаются огромным морфологическим разнообразием и тесно связаны со всеми аспектами жизни человека, включая дыхание (от фотосинтеза растений зависит состав воздуха), продукты питания, лекарственные средства и многое другое (Рейвн et al., 1990). Растения делятся на низшие и высшие, или наземные, зеленые растения (эмбриофиты), к которым относятся покрытосеменные, или цветковые, виды (более 250 000) (Рейвн et al., 1990).

Развитие растения начинается с прорастания семени, которое состоит из зародыша, семенной кожуры и эндосперма с запасом питательных веществ. Образующийся гипокотиль, несущий одну или две семядоли, имеет две апикальные меристемы – побега (АМП) и корня (АМК). АМП цветковых растений состоит из центральной зоны (содержит столовые клетки), окружающей ее периферийной зоны и сердцевинной зоны (клетки основной массы стебля). Клетки центральной зоны делятся, дочерние клетки пополняют пул столовых клеток, и часть дочерних клеток поступает в периферийную зону, где дифференцируются. Судьба меристемных клеток определяется их положением (Sharma and Fletcher, 2002).

Развитие растения делится на вегетативную и репродуктивную фазы. В вегетативной фазе за счет деления и дифференцировки клеток АМП формируются стебель и листья. В репродуктивной фазе АМП переходит в состояние меристемы соцветия (МС), которая производит цветковые меристемы (ЦМ) с четырьмя кругами органов (чашелистики, лепестки, тычинки (андроцей) и плодолистики (гинецей; пестик)) (рис. 1, 2) (Meyerowitz, 1997; Greb and Lohmann, 2016). В завязи формируются семязачатки (будущие семена), и жизненный цикл растения завершается (Рейвн et al., 1990).



(D) Под центральной зоной (стволовые клетки) находится организационный центр, ответственный за поддержание популяции стволовых клеток. Под ним расположена сердцевина меристемы (клетки стебля). Периферийная зона переходит в пограничный домен и далее – в примордии латеральных органов (Greb and Lohmann, 2016)

Рисунок 1 – Схема соцветия модельного вида *Arabidopsis thaliana* L., вид сбоку (A) и сверху (B); МС – меристема соцветия, ЦМ – цветковая меристема (Meyerowitz, 1997); растение *A. thaliana* с вынесенными электронными фотографиями АМП (shoot apical meristem), АМК (root apical meristem) и среза побега (centrum) (C); структура АМП (D)

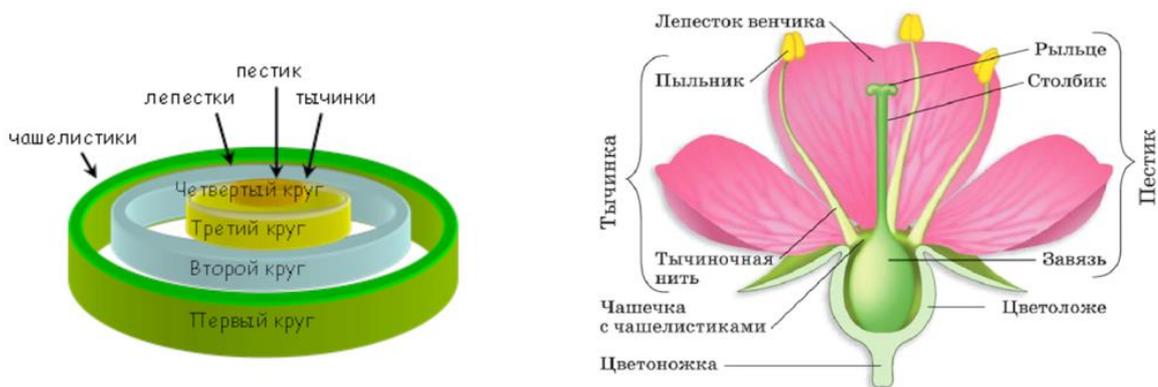


Рисунок 2 – Общепринятая модель цветка покрытосеменных растений, в котором органы расположены кругами (мутовками)

Изложенное выше описание развития вегетативной части растения и структуры цветка является обобщающим. Виды растений могут существенно различаться особенностями архитектуры и вегетативной, и репродуктивной части (Рейвн et al., 1990). Исследование движущей силы, механизмов и закономерностей разнообразия растений составляет целое направление в науке и основано на сравнительном меж- и внутривидовом анализе (морфологическом, молекулярно-генетическом, др.).

1.2. Высшие растения: эволюция, domestикация, селекция

Огромное разнообразие современных видов растений считается результатом адаптационной эволюции их предшественников и искусственного отбора, вследствие чего в настоящее время мы имеем множество различных агрокультур в растениеводстве, с помощью которых успешно решаем продовольственные проблемы (Litrico and Violle, 2015).

Одомашнивание растений произошло в течение периода <10 000 лет, и для большинства сельскохозяйственных культур все еще существуют генетически близкие им дикорастущие формы, сравнение с которыми позволяет определить молекулярные мишени, основы domestикации (Olsen and Wendel, 2013).

Совокупность фенотипических признаков, возникших в результате domestикации дикорастущих предшественников и направленных на облегчение выращивания культуры и повышение объема и качества урожая, получила название синдрома одомашнивания. К примеру, в случае зерновых культур сюда вошли признаки неосыпаемости семян, повышенной продуктивности колоса, дружности всходов, устойчивости к полеганию стебля, и прочее. Доместичированные культуры подвергались далее селекции по признакам улучшения вкусовых и питательных характеристик урожая, вариациям размеров, формы и пигментации (зерно, плод,

клубень), а также по адаптации к разным климатическим зонам, результатом чего стало огромное сортовое разнообразие (Schilling et al., 2018).

Современная селекция направлена на увеличение урожайности, ускорение созревания, стрессоустойчивость, а также повышение питательной ценности, потребительской привлекательности и сроков хранения продукта (Olsen and Wendel, 2013). Прогресс в данном направлении достигается объединением методов традиционной селекции с передовыми молекулярными технологиями, включая изучение геномов, функциональный анализ генов, поиск связанных с признаком генов и локусов, картирование ассоциированных с признаками полиморфизмов, генетический скрининг популяций, и многое другое.

К настоящему времени описаны десятки генов и генетических мутаций, лежащих в основе хозяйственно-ценных признаков агрокультур. При этом все более очевидно, что многие признаки определяются целым рядом генов небольшого эффекта. Почти треть ассоциаций ген-признак связана с чувствительностью к фотопериоду и сроками цветения/созревания (Schilling et al., 2018). Многие из этих генов, ассоциированных с признаками, кодируют структурные белки или ферменты. Однако наиболее эффективные мишени отбора агрокультур представлены генами регуляторов транскрипции. Полиморфизмы, связанные с одомашниванием, включают *цис*-регуляторные мутации, которые изменяют экспрессию генов, а также мутации в кодирующих областях, которые приводят к модуляциям функциональной активности белков.

Важными источниками генетических вариаций у сельскохозяйственных растений считаются активность мобильных элементов (МЭ) и события дупликации генов. Показано, что МЭ составляют от 22% до 85% генома у 11 исследованных видов агрокультур (Morrell et al., 2011). Ряд МЭ-опосредованных мутаций лежат в основе характеристик, связанных с одомашниванием. Как пример, можно привести локус *tb1*, который является результатом вставки ретроэлемента *Hopscotch* в *цис*-регуляторную область гена и благодаря которому одомашненная кукуруза (*Zea mays* subsp. *mays*) отличается от своего дикого предка теосинте (*subsp. parviglumis*) отсутствием развития пазушных побегов (одностеблевое растение) (Studer et al., 2011). Отсутствие пигментации ягод белого винограда возникло вследствие подавления синтеза антоцианов в результате последовательного отбора на ноль-мутации двух регуляторных генов антоцианового пути: однонуклеотидная несинонимичная мутация в *VvMYBA2*, а затем вставка в промотор *VvMYBA1* *gypsy*-типе ретротранспозона *Gret1* (Fournier-Level et al., 2010). Удлиненная форма плода томата (*Solanum lycopersicum* L.) некоторых сортов появилась в результате *Copia*-like ретротранспозонной дупликации гена *SUN* (Xiao et al., 2008). В красных апельсинах выработка антоцианов происходит благодаря индукции транскрипции *Myb*-гена *Ruby* (регуляторный ген пути синтеза антоцианов) из-за активности *Copia*-like ретротранспозона при воздействии холода на созревающие плоды (Butelli et al., 2012).

Дупликация генов с образованием мультигенных семейств является важным явлением в эволюции генома и доместикации растений. Одним из примеров последнего является приведенная выше МЭ-опосредованная дупликация гена *SUN* томата (Xiao et al., 2008). Другой пример касается появления в геноме подсолнечника (*Helianthus annuum* L.) паралогичных копий гена *MADS-box FLOWERING LOCUS T (FT)*, которые различались по профилю экспрессии и по-разному воздействовали на сроки инициации цветения (Blackman et al., 2011).

Большую роль в создании адаптивной пластичности и новых фенотипических вариаций ценных признаков сыграла полиплоидизация генома, широко распространенная среди покрытосеменных растений. К примеру, гексаплоидная мягкая пшеница возникла в результате гибридизации тетраплоидной (содержащей предковые диплоидные геномы А и В) и диплоидной (геном D) пшеницы. Признак твердого зерна характерен для тетраплоидной пшеницы и возник в результате делеции из геномов А и В комплексного локуса твердости (*Ha*), который присутствует во всех трех предковых диплоидных геномах. Предковый фенотип мягкого зерна был восстановлен в мягкой пшенице за счет вклада локуса *Ha* из D-генома; последующий отбор по делециям и сложным перестройкам в локусе D-генома дал начало полутвердым гексаплоидным пшеницам (Chantret et al., 2004).

Полиплоидные организмы часто проявляют повышенную жизнеспособность и другие улучшения хозяйственно-ценных признаков. Это способствовало привлечению в селекцию природных полиплоидов, а также развитию методов искусственной индукции полиплоидии. Были созданы сорта с более высокой урожайностью, качеством продукции и устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Sattler et al., 2016). Метод получения полиплоидов (под действием мутагенов, нарушающих расхождение хромосом в мейозе и митозе) широко применяется селекционерами для создания новых полиплоидных сортов, таких, как виноград (Ji et al., 2015), сахарная свекла (Hallahan et al., 2018) или арбуз (Verhage, 2021).

1.2.1. Между генотипом и фенотипом

В современном мире происходит быстрое развитие и расширение применения высокопроизводительных технологий для изучения геномов сельскохозяйственных растений. Такие исследования значительно обогащают понимание основ конкретных признаков как реализации генотипа через транскриптомные, протеомные и метаболомные сети.

К примеру, сопоставление данных секвенирования генома кукурузы с профилированием экспрессии генов обнаружило множество геномных локусов, которые могли служить мишенями доместикации (484) и улучшения агрокультур (695) (Schilling et al., 2018). Было показано, что около 600 генов, лежащих в данных локусах, дифференциально экспрессируются при сравнении образцов кукурузы и теосинте (Swanson-Wagner et al., 2012). Протеомное

профилирование элитного сорта и дикорастущего образца хлопка позволило идентифицировать около 1000 различных белков в клетках волокон, из которых около 20% показали дифференциальную экспрессию между дикими и культивируемыми формами (Hu et al., 2013).

1.2.2. Генетическая основа параллельной эволюции: время цветения как пример

Эволюция признаков, являющихся целью доместикации, считается тесно связанной с инициацией цветения, так как продвижение одомашненной культуры в другие климатические зоны требует изменения сроков ее репродукции. К примеру, предшественники кукурузы происходят из тропиков и субтропиков и цветут при коротком дне. Культивирование кукурузы в широтах умеренного климата привело к селекции генотипов с измененной реакцией на длительность фотопериода, что позволило выращивать их в условиях летнего долгого дня в более высоких широтах (Romero Navarro et al., 2017).

Другой пример адаптивной реакции – приобретенная или потерянная потребность в длительном периоде холода (яровизация или вернализация) для инициации цветения. В первом случае это морозоустойчивые озимые сорта пшеницы и рапса (Hou et al., 2012; Schilling et al., 2018), во втором – яровые сорта пшеницы и ячменя (Schilling et al., 2018).

Различные реакции агрокультур на фотопериод и/или яровизацию связаны с изменением профиля экспрессии регуляторных генов, определяющих инициацию цветения и поэтому являющихся мишенью доместикации и селекции. Сюда входят гены, ортологичные генам *Arabidopsis*, ассоциированным с яровизацией (к примеру, *MADS-box* ген *FLOWERING LOCUS C (FLC)*), фотопериодом и циркадным ритмом (*CONSTANS (CO)* и *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*), инициацией цветения (*MADS-box* гены *FT* и *APETALA1 (API)*), а также автономными сигнальными путями (например, гиббереллин- (GA) опосредованными) (Schilling et al., 2018) В этой связи важно помнить, что структурно гомологичные гены не всегда выполняют полностью сходную функцию у разных видов. Так, ген *CO* стимулирует цветение *Arabidopsis* в условиях долгого дня, а его гомолог у риса (*Oryza sativa* L.), ген *Hdl*, в зависимости от длины дня либо подавляет (длинный фотопериод), либо активирует (короткий) цветение (Tsuji et al., 2011).

Агрокультуры как результат искусственного отбора продолжают совершенствоваться селекционерами по различным признакам урожайности и стрессоустойчивости. При этом селекция перешла на новый уровень, благодаря активно накапливаемым молекулярно-генетическим данным о полигенной природе хозяйственно-ценных характеристик (Zohary, 2004; Purugganan, 2019), а также возможности интрогрессивной гибридизации культурных растений с дикорастущими сородичами как источниками важных признаков (Purugganan, 2019). Отметим, что гены-мишени доместикации/селекции у различных видов растений

консервативны (ортологичны), что может способствовать научно-обоснованному прогнозированию при направленной селекции разных культур.

1.2.3. Транскрипционные факторы как мишени при искусственном отборе растений

Большинство признаков, редактируемых в процессе доместикации, определяются не одним, а множеством генов меньшего или большего эффекта, каждый из которых вносит свой вклад в результат (Romero Navarro et al., 2017; Schilling et al., 2018). Считается, что структура и функция генов, от которых зависит большая часть проявления желаемого признака, высоко консервативны среди видов растений, тогда как дополняющие их гены малого действия более переменны и требуются для более точной настройки признака и нейтрализации возможных негативных эффектов его проявления для растения (Schilling et al., 2018). Поэтому современная селекция агрокультур часто направлена на идентификацию генов и/или их аллелей, ассоциированных с большим эффектом и отсутствием отрицательных последствий для растения, и поиск доноров таких генов/аллелей.

В большинстве случаев генами большего эффекта являются гены, кодирующие ТФ (Schilling et al., 2018). Действительно, значительная часть (43–81%) идентифицированных к настоящему времени генов одомашнивания и селекции является генами регуляторов транскрипции (Purugganan, 2019). Это согласуется с результатами исследований, где продемонстрирована подконтрольность развития и морфологии растений регуляторной активности ТФ (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). Поскольку ТФ способны регулировать пространственно-временной профиль и уровень экспрессии множества других генов, то изменение активности ТФ может привести к модификациям целого ряда признаков и, как следствие, к радикальным фенотипическим изменениям в относительно короткие временные периоды (Schilling et al., 2018).

1.3. MADS-доменные ТФ как главные регуляторы развития растений и ценных признаков отбора

Среди множества растительных семейств ТФ одну из наиболее важных позиций занимают белки, в состав которых входит домен MADS (*Saccharomyces cerevisiae* MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1), *Arabidopsis* AGAMOUS (AG), *Antirrhinum majus* DEFICIENS (DEF) и *Homo sapiens* SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)) (Smaczniak et al., 2012).

Некоторые MADS-box гены растений считаются гомеотическими, поскольку выключение их функции сопровождается превращением одних органов цветка в другие (Jack et al., 1992). Геном модельного растения *Arabidopsis* содержит 107 генов MADS-box (Parenicová et al., 2003). У различных сельскохозяйственных культур их количество может варьировать от 59

(свекла *Beta vulgaris*) до 223 (пшеница *Triticum aestivum*) (Schilling et al., 2018). Помимо решающей роли в определении идентичности органов цветка, гены *MADS-box* участвуют в контроле времени цветения, архитектуры соцветия и корневой системы, развития семян/плодов и других процессов онтогенеза (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). Гены *MADS-box*, ортологичные между видами растений, объединены в подсемейства (Parenicová et al., 2003; Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). К примеру, у всех видов цветковых растений имеется хотя бы один *MADS-box* ген подсемейства *AP3*, члены которого необходимы для закладки лепестков и тычинок цветка (Theißen et al., 2018).

События эволюционной дупликации генов *MADS-box* привели к суб/неофункционализации и функциональной избыточности у многих видов растений (Smaczniak et al., 2012). К примеру, в геноме *Arabidopsis* ген *AG*, от которого зависит идентичность репродуктивных органов цветка (тычинок и плодолистиков, составляющих пестик), имеет два паралогичных гена – *SHATTERPROOF1 (SHP1)* и *SHP2*, функция которых ограничена преимущественно регуляцией развития семязачатков (Pinyorich et al., 2003). Нулевая мутация *ag* приводит к замене андроеца и гинецея лепестками и новым цветком с той же морфологией. При этом конститутивная экспрессия генов *SHP1* и *SHP2* в растениях *ag* восстанавливает развитие тычинок и плодолистиков, что указывает на сходство функций *SHP1* и *SHP2* с *AG*, которое обычно нивелируется тканеспецифичностью экспрессии генов (Pinyorich et al., 2003). То есть дупликация генов изменила область их активности, но не функцию.

Может быть и обратный вариант – изменение функции при сохранении профиля экспрессии, как, например, произошло с паралогичными генами идентичности ЦМ *Arabidopsis* – *API* и *CAULIFLOWER (CAL)*. Мутация *ap1* вызывает сильные нарушения ЦМ, *cal* – практически не заметные, а *ap1 cal* приводит к значительному усилению эффекта *ap1* вплоть до фенотипа «цветной капусты» (Kempin et al., 1995). Всего несколько полиморфизмов в высокоомологичных последовательностях ТФ *CAL* и *API* приводят к различиям в их белок-белковых взаимодействиях и, как следствие, в их функции (Rijpkema et др., 2007).

Эволюция генов *MADS-box*, их вклад в диверсификацию царства растений, а также domestикацию и селекцию агрокультур интенсивно исследуются на протяжении последних десятилетий (Smaczniak et al., 2012; Schilling et al., 2018; Theißen et al., 2018; Нежданова и Щенникова, 2021).

1.3.1. *MADS-box* гены и вернализация

Стимулом перехода к репродуктивной фазе развития цветковых растений часто служит воздействие низких температур, что связано с адаптацией к низкотемпературным сезонам года и является мишенью domestикации, поскольку способствует географическому

распространению культур. Наличие или отсутствие ответа на холодовой стимул активно используется в селекции для получения озимых и яровых сортов (Amasino and Michaels, 2010).

Ключевую роль в ответе на вернализацию играют гены *MADS-box*. У *Arabidopsis* основной регулятор времени цветения – *MADS-box* ген *FLC*, отменяющий цветение путем репрессии генов *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS D (FD)* и *FT* (Amasino and Michaels, 2010). Данный эффект нейтрализуется длительным воздействием холода, из-за чего снижается экспрессия *FLC* и активируются гены цветения (Whittaker and Dean, 2017). Генетические вариации *FLC* сцеплены с разной степенью чувствительности к вернализации у экотипов *Arabidopsis* (Amasino and Michaels, 2010). Именно гены *FLC*, ортологичные вариантам генов *Arabidopsis*, сыграли важную роль в адаптации других видов растений к изменениям климата.

В качестве яркого примера можно привести исследование ортологов *FLC* у культур рода *Brassica*, среди которых китайская капуста (*B. rapa* ssp. *pekinensis*), цветная капуста (*B. oleracea* ssp. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), репа (*B. rapa* ssp. *rapa*), а также выращиваемые ради богатых маслом семян рапс (*B. napus*) и горчица полевая (*B. rapa* ssp. *oleifera*). В зависимости от товарного продукта, у культивируемых видов *Brassica* разные требования к времени цветения. Так, в случае китайской капусты необходимы сорта, не склонные к цветению даже при яровизации, а желательные сорта рапса и горчицы должны давать семена в самых разных условиях и, в связи с этим, отбираются и озимые, и яровые образцы (Kakizaki et al., 2011; Hou et al., 2012; Li et al., 2016).

В геноме *B. rapa* присутствуют четыре гена-ортолога *FLC* (*BrFLC1*, 2, 3 и 5) и от их дифференциальной активности зависят сроки цветения у сортов (Kakizaki et al., 2011; Hou et al., 2012; Xiao et al., 2013; Dong et al., 2016). Последовательность *BrFLC1* содержит полиморфизмы, приводящие к альтернативному сплайсингу гена, что способствует позднему цветению сортов китайской капусты (Kakizaki et al., 2011). В случае гена *BrFLC2* это полиморфизмы, которые коррелируют с ускоренным цветением рапса (Wu et al., 2012; Xiao et al., 2013). В геноме озимых сортов *B. napus* имеется аллельный вариант *BnFLC10* со вставкой мобильного элемента *MITE* в регуляторной области, который ассоциирован с приобретением потребности в яровизации (Hou et al., 2012). У образцов брокколи присутствует аллель *BoFLC4* (или *BoFLC2*), связанный с изменением времени инициации цветения (Irwin et al., 2016). Таким образом, вариации паралогичных генов *FLC* у видов *Brassica* способствовало тонкой настройке функции *FLC* во время доместикации.

Яровизация злаковых культур, кроме *FLC*, регулируется генами *VERNALIZATION (VRN)*; у пшеницы это *VRN1*, *VRN2*, *VRN3* и *VRN4*, где *VRN1* и *VRN4* являются *MADS-box* генами подсемейства *API/FRUITFULL (FUL)* (Schilling et al., 2018). Регуляторные области *VRN1*

содержат различные мутации, которые сцеплены с широким спектром чувствительности к яровизации у пшеницы и ячменя (вплоть до потери потребности в яровизации). В результате дупликации гена *VRN1* в геноме *T. aestivum* появился паралогичный ген *VRN4*, ассоциированный со сниженной потребностью генотипов в вернализации (Schilling et al., 2018).

Древесные растения, включая фруктовые деревья, переходят осенью в фазу физиологического покоя и для весеннего выхода из него требуют обработки холодом, что говорит о сходстве регуляции данного процесса и ответа на вернализацию (Cooke et al., 2012). Несмотря на участие генов *FLC* в весенней активации почек (Porto et al., 2015), ключевая роль в контроле состояния покоя отведена группе *MADS-box* генов *DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)*. Гены *DAM* входят в подсемейство *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*; белки *SVP* участвуют в регуляции времени цветения *Arabidopsis*, в том числе, взаимодействуя с *FLC* (Mateos et al., 2015; Allard et al., 2016). Гены *DAM* являются репрессорами выхода почек из состояния покоя; яровизация подавляет экспрессию генов *DAM*, инициируя раскрытие почек; при отсутствии активности генов *DAM* происходит непрерывный рост деревьев, что предпочтительно для климата без холодных сезонов (Schilling et al., 2018). Данную группу генов связывают с доместикацией плодовых деревьев по срокам цветения в разном климате.

Зависимость цветения от активности групп генов *FLC*, *VRN* и *DAM*, ставших мишенью доместикации, и сегодня используется в селекции. К примеру, получены линии *B. rapa*, не требующие яровизации за счет замалчивания гена *BrFLC2* (Li et al., 2016). Снижению потребности в яровизации озимого рапса способствовала сверхэкспрессия гена *MADSB* (*Sinapsis alba*), ортологичного *FUL* (Chandler et al., 2005). Сверхэкспрессия гена *BpMADS4* (*Betula pendula*), ортологичного *FUL*, у яблони (*Malus* sp.) способствовала сокращению ювенильной стадии (Flachowsky et al., 2007). Сверхэкспрессия гена *API* (*Arabidopsis*) у цитрусовых деревьев привела к очень раннему цветению всего через 1 год без изменения структуры соцветия (Peña et al., 2001).

1.3.2. *MADS-box* гены и архитектура соцветия

Одним из важных критериев доместикации и селекции стал отбор по особенностям архитектуры соцветия (Purugganan, 2019). Ярким примером являются соцветия цветной капусты и брокколи (Duclos and Björkman, 2008). Как упоминалось выше, у *Arabidopsis* соцветие «цветной капусты» появляется в случае нулевой мутации двух *MADS-box* генов *API* и *CAL* (Bowman et al., 1993; Kempin et др., 1995). И у брокколи, и у цветной капусты нарушена функция ортологичных *API* и *CAL* генов (*BoCAL*, *BoAPI*) (Kempin et al., 1995; Purugganan, 2019). То есть, при доместикации/селекции были отобраны образцы *B. oleracea* с молчащими аллелями *BoCAL* и/или *BoAPI*. При этом разная степень остаточной активности генов (а также

присутствие дублированных копий *BoAPI*) определяет различия между фенотипами цветной капусты, брокколи и промежуточных вариантов (Duclos and Björkman, 2008).

MADS-box гены клады *SEPALLATA 1 (SEP1) – LONG INFLORESCENCE (LIN)*, *JOINTLESS 2 (J2)* и *ENHANCER OF JOINTLESS 2 (EJ2)*, считаются регуляторами ветвления соцветий томата. Комбинируя мутации *j2*, *ej2* и *lin*, удалось получить фенотипы со слабым ветвлением и повышенной скоростью образования плодова мутация *ej2* дополнительно привела к изменению морфологии чашелистиков (Soyk et al., 2017).

Исследование растений с гомеотическими мутациями органов цветка обнаружили, что именно гены *MADS-box* являются ключевыми регуляторами идентичности цветковых органов. Полученные данные стали основой модели ABC(E), согласно которой различные комбинации *MADS*-доменичных ТФ пяти классов генетической активности определяют идентичность мутовок (кругов цветка): А+Е – чашелистиков; А+В+Е – лепестков; В+С+Е – тычинок; С+Е – плодолистиков (Theißen et al., 2018). У модельного вида *Arabidopsis* класс А представлен геном *API*, В – *PISTILLATA (PI)* и *AP3*, С – *AG*, *SHP1*, *SHP2*, *SEEDSTICK (STK)* (в некоторых работах ген относят к D-активности), и Е – *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* и *SEP4* (Jack et al., 1992; Goto and Meyerowitz, 1994; Pelaz et al., 2000; Pinyorich et al., 2003; Ditta et al., 2004).

Как уже говорилось (раздел 1.3), при нулевой мутации *ag* образуются цветки с лепестками вместо тычинок и новым цветком на месте пестика. Данное явление лежит в основе фенотипа «махрового цветка» у различных видов декоративных растений (например, *Prunus lannesiana* и *Thalictrum thalictroides*) (Liu et al., 2013; Theißen et al., 2018). Отсутствие тычинок в цветках с мутацией *ag* приводит к формированию бессемянных плодов с увеличением сроков их хранения, что продемонстрировано на примере яблони с подавленной экспрессией *AG*-генов *MdMADS15* и *MdMADS22* (Pandolfini, 2009; Klocko et al., 2016). Эффект мужской стерильности в цветках яблони наблюдается также при выключении гена *MdPI* (ортолог *PI*) (Yao et al., 2001). У злаковых культур данный признак связан с выключением *AG*-генов (к примеру, *OsMADS3* у риса *O. sativa*) и используется в селекции для достижения полного перекрестного опыления (Zhang et al., 2015).

1.3.3. *MADS-box* гены и признаки урожайности

Важными признаками отбора растений являются характеристики плода (размер, количество семян, сроки созревания и хранения и др.), регуляция которых тесно связана с активностью генов *MADS-box*, в частности, генов подсемейств *AG*, *API/FUL* и *SEP*. Данные гены, следовательно, являются мишенями при селекции улучшенных сортов.

Исследования механизмов определения сроков созревания и послеуборочного хранения климактерических сочных плодов сельскохозяйственных растений (например, банана *Musa*

acuminata) свидетельствуют о значимом вкладе *MADS-box* генов подсемейства *SEP* (Elitzur et al., 2016; Schilling et al., 2018). Также имеются работы о роли генов *SEP* в развитии и созревании неклиматических плодов (например, клубники *Fragaria × ananassa*) (Seymour et al., 2013). Созревание плода томата тесно связано с активностью *SEP*-гена *RIPENING INHIBITOR (RIN)* (Vrebalov et al., 2002). Мутация *rin* замедляет созревание и тем самым продлевает срок хранения томатов, что облегчает их послеуборочную обработку и транспортировку (Bai and Lindhout, 2007). Данная мутация затрагивает часть промотора tandemно расположенного другого *MADS-box* гена *MACROCALYX (MC)*, гомологичного *FUL*, экспрессия которого в растениях *rin* понижена, что приводит к укрупнению чашелистиков и отложенному опадению плодов (Vrebalov et al., 2002; Nakano et al., 2012). Внесение мутаций в кодирующую последовательность гена *RIN*, не затрагивающих регуляцию гена *MC*, способствовало получению селекционного материала для создания сортов с повышенным сроком хранения плодов (Ito et al., 2017).

Как говорилось выше, бессемянность плодов положительно связана с увеличением сроков хранения (раздел 1.3.4). На примере *Arabidopsis* показано, что тройная мутация *stk shp1 shp2* (гены подсемейства *AG*) приводит к тому, что семена не формируются или abortируются (Liljegen et al., 2000; Pinyorich et al., 2003). Отсутствие косточек в сочных плодах успешно достигается подавлением активности генов клады *STK*. К примеру, у безкосточковых сортов винограда (*Vitis vinifera*) значительно снижена экспрессия *STK*-гена *VviAGL11* из-за мутаций в области промотора (Mejía et al., 2011). У томата полное или частичное замалчивание *STK*-гена *SlyAGL11* также сопровождается сокращением или полным отсутствием семян в плодах (Ocares and Mejía, 2016).

Гены *SHP1* и *SHP2* (*Arabidopsis*) вместе контролируют раскрытие стручка, сопровождающееся осыпанием семян; при двойной нуль-мутации *shp1 shp2* раскрытия не происходит (Liljegen et al., 2000; Pinyorich et al., 2003). Это используется в селекции высокоурожайных масличных сортов рапса, устойчивых к преждевременному раскрытию стручков (Kord et al., 2015). Гены *FUL* регулируют клеточную дифференцировку в процессе развития, созревания и растрескивания плода и способны подавлять *SHP1* и *SHP2* (Ferrándiz et al., 2000).

Кроме растрескивания плода/осыпания семян, важным признаком отбора является осыпание самих плодов, которое, к примеру, у томата зависит от наличия зоны отторжения на плодоножке. Закладка этой зоны регулируется генами подсемейства *SEP* – *J2* и *J1*; нуль-мутация *j2* или *j1* приводит к отсутствию зоны отторжения; растения *j1* практически не используются в селекции томата, так как часто ревертируют к вегетативному развитию после образования всего нескольких цветков (Soyk et al., 2017).

1.3.4. Мультифункциональность *MADS-box* генов

Многие признаки, затронутые доместикацией, связаны не с арестом соответствующего молекулярно-генетического пути, а с его перенастройкой, критическое участие в которой часто принимают гены *MADS-box*. В качестве примера можно привести уже упомянутые выше паралогичные гены подсемейств *FLC* и *SEP*, сцепленные с настройкой времени цветения и архитектуры соцветия у томата и *Brassica sp.* (Irwin et al., 2016; Soyk et al., 2017). Паралогичные *MADS-box* гены способны дополнять и частично заменять друг друга в процессе осуществления функции (функциональная избыточность). Так, у *B. rapa* гены *FLC* совместно контролируют переход к цветению (Xiao et al., 2013), а у томата разные комбинации генов *SEP* определяют структуру соцветия (Soyk et al., 2017).

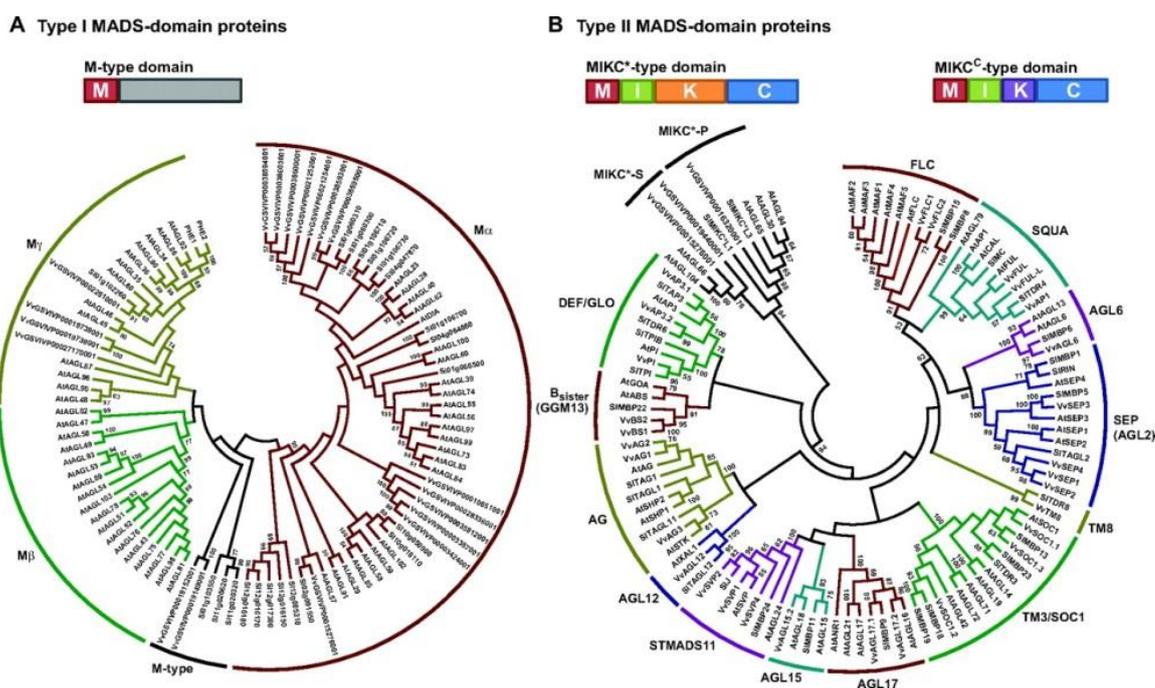
Иногда плейотропные эффекты негативно сказываются на признаке. К примеру, каждая из мутаций *j2* и *ej2* оказывает благотворное воздействие на морфологию плода и его прикрепление, тогда как комбинация *j2 ej2* приводит к сильному ветвлению соцветия (приветствуется) и повышенной абортивности цветков (нежелательно) (Soyk et al., 2017). Подобные эффекты возможно нейтрализовать или смягчить, меняя сочетание аллельных вариантов генов (Soyk et al., 2017). Потенциал точной настройки фенотипа расширяется также эффектом дозозависимой активности аллелей *MADS-box* генов в отношении времени цветения, идентичности соцветий и развития плодов (Singh et al., 2013).

Поскольку *MADS-box* гены обладают структурно-функциональным консерватизмом между видами растений, это успешно используется в научно-обоснованной селекции агрокультур (Soyk et al., 2017). На основе известных данных, полученных на различных видах растений, выбираются конкретные гены-мишени, связанные с целевыми признаками. Модификация *цис*-регуляторных элементов таких генов может привести к изменению профиля экспрессии гена и, как следствие, получению нужного фенотипа (Rodríguez-Leal et al., 2017). Функциональная активность самого MADS-ТФ (связывание с белками-партнерами и/или с промотором генов-мишеней) модулируется с помощью внесения в его кодирующую последовательность мутаций (Immink et al., 2010). При этом необходимые модификации могут быть предсказаны с учетом огромного массива данных по *MADS-box* генам, накопленного к настоящему времени. Потенциал использования *MADS-box* генов для улучшения агрокультур требует дальнейших функциональных исследований у широкого круга видов для более детального понимания свойств и роли MADS-доменных ТФ.

1.3.5. Характеристика семейства *MADS-box* генов

Семейство генов *MADS-box* было охарактеризовано у модельных видов *A. thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Petunia x hybrida*, *S. lycopersicum*, *Gerbera x hybrida* и *O. sativa* (Smaczniak et al., 2012), а также у многих других видов растений. Первоначально были обнаружены самые очевидные функции генов *MADS-box* (спецификация органов цветка), однако дальнейшие исследования выявили их участие во многих процессах онтогенеза на протяжении всего жизненного цикла растения (Smaczniak et al., 2012). Семейство генов *MADS-box* высших растений за счет эволюционных событий дупликации насчитывает значительно больше членов, чем у животных или грибов (De Vlodt et al., 2003).

Семейство подразделяется на типы I и II, в зависимости от доменной структуры кодируемых белков (рис. 3). Группа генов типа I характеризуется консервативной последовательностью (~180 п.н.), кодирующей ДНК-связывающий MADS-домен, и делится на подклассы M α , M β и M γ (De Vlodt et al., 2003; Parenicová et al., 2003). Генов типа I больше, чем генов типа II, однако их функция настолько неочевидна, что открыты они были только после завершения секвенирования генома *Arabidopsis* (Smaczniak et al., 2012).



Белки типа I имеют только один консервативный домен (MADS), тогда как белки типа II включают три консервативных последовательности (MADS, I, K) (Smaczniak et al., 2012)

Рисунок 3 – Структура и разделение MADS-доменных белков на типы I (слева) и II (справа) на примере анализа семейств у видов *A. thaliana*, *V. vinifera* и *S. lycopersicum*

Группа типа II содержит уже известные гомеотические гены, а также гены со сходной структурой, участвующие в различных процессах развития растения. Структура MADS-ТФ

типа II (MIKC) состоит из домена MADS (M), кератин-подобного домена (K), области между доменами (I) и С-конца (C) (Smaczniak et al., 2012). Последовательность MIK консервативна у видов растений, тогда как С-область высоко вариабельна. Домен M отвечает за связывание ТФ с промотором гена-мишени и (вместе с I и K) димеризацию MADS-белков. Участки I, K и C отвечают за образование тетрамерных MADS-белковых комплексов; область C также связана с регуляцией транскрипции гена-мишени (Kaufmann et al., 2010; Smaczniak et al., 2012).

ТФ типа II делятся на группы MIKC^C и MIKC*, которые различаются структурой K-домена (Kwantes et al., 2012). Гены MIKC^C распределяются по нескольким подсемействам (рис. 3), в основном в зависимости от структуры С-области (Smaczniak et al., 2012). Среди них уже упоминаемые выше подсемейства *AG*, *API/FUL*, *SEP*, а также другие подсемейства, члены которых обладают структурно-функциональной гомологией между видами растений (Smaczniak et al., 2012). К примеру, гены подсемейства *AG* определяют идентичность репродуктивных органов, а гены подсемейства *SOC1* (или *AGL20*) участвуют в регуляции инциации цветения у различных видов растений. Интересно, что многие гены MIKC^C-типа действуют более чем в одном процессе развития или на разных стадиях развития растения (Smaczniak et al., 2012).

1.3.6. *MADS-box* гены и длительность стадий онтогенеза растения

Две главные фенофазы в развитии растения – это период от образования первых настоящих листьев (ювенильная фаза) до формирования взрослого растения (перед репродуктивной стадией), и далее период репродуктивного развития (раздел 1.1). Переходы регулируются внешними и внутренними факторами, которые запускают различные сигнальные каскады, находящиеся под контролем регуляторов транскрипции, многие из которых являются MADS-доменными ТФ MIKC^C-типа (рис. 4).

В регуляции перехода от ювенильного состояния к взрослому и температуро-зависимого прорастания семян участвует FLC (Chiang et al., 2009). Кроме того, как уже говорилось, FLC является репрессором перехода к цветению: он взаимодействует с SVP, и совместно они подавляют экспрессию генов индукторов цветения *FT* и *SOC1* (Liu et al., 2008; Whittaker and Dean, 2017). SVP также активирует экспрессию других репрессоров цветения, включая ТФ семейства AP2 (Tao et al., 2012). Еще одним индуктором цветения является ТФ AGL24; активация генов *SOC1* и *AGL24* служит сигналом для ТФ LEAFY (LFY), который в ответ запускает цветение (Weigel et al., 1992). АМП переходит в MC и формирует ЦМ; совместное действие SVP, SOC1 и AGL24 предотвращает преждевременную активацию *MADS-box* генов, запускающих закладку органов цветка (Liu et al., 2009; Tao et al., 2012; Torti et al., 2012).

1.3.7. *MADS-box* гены и вегетативное развитие растения

Почти половина генов МІКС^С-типа *Arabidopsis* экспрессируется в корнях (Parenicová et al., 2003), что свидетельствует об их участии в развитии корневой системы растения. Сюда, в частности, входят гены *AGL16*, *AGL17*, *AGL21*, *AGL44* (*ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1*, *ANR1*)), *AGL12* (*XAANTAL 1*, *XAL1*), *AGL14* (*XAL2*), *SOC1*, *AGL42*, *AGL71*, *AGL72*, а также гены клад *AG*, *SEP*, *API/FUL AP3/PI*, *AGL79* и *AGL18* (Alvarez-Buylla et al., 2019).

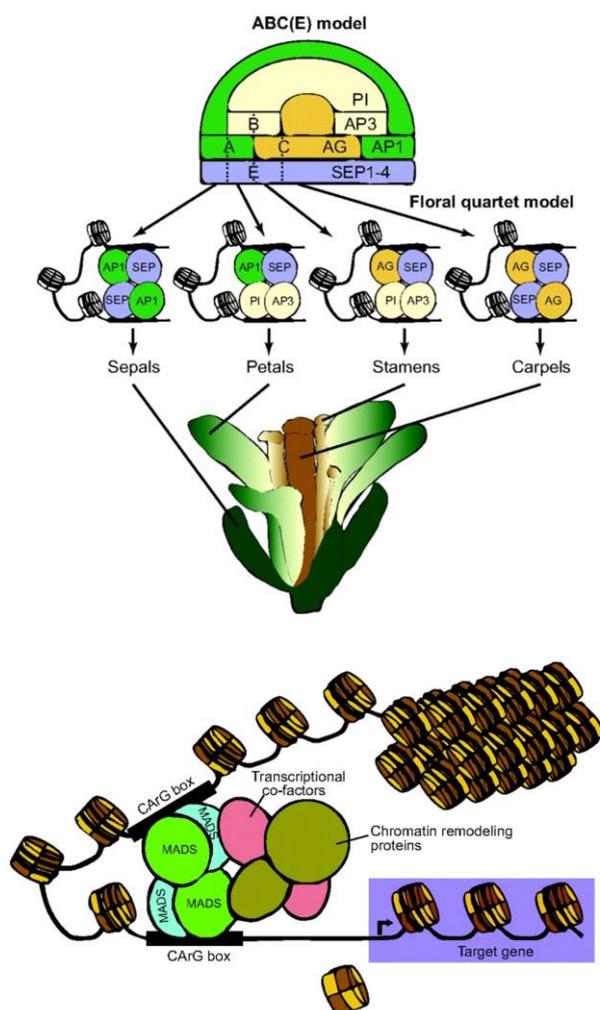
Уровень транскриптов *AGL44*, *AGL16* и *AGL21* меняется в зависимости от содержания различных микроэлементов, включая нитраты. *AGL21* взаимодействует с белком *SIEL*, связанным с эндосомами и способствующим межклеточному движению ТФ в корнях, *XAL1* и *XAL2* контролируют ауксин-зависимый рост корней, *AGL44*, *SOC1*, *SHP1*, *SHP2* и *STK* участвуют в образовании боковых корней (Smaczniak et al., 2012). Как и в АМІ, в АМК вблизи к кончику корня присутствуют ниша стволовых клеток и организующий центр (или покоящийся центр QC) (Alvarez-Buylla et al., 2019). Гены *AGL42*, *AGL16*, *AGL17*, *AGL18* и *AGL21* преимущественно экспрессируются в QC. Также в QC обнаружена экспрессия гена *PI*. Роль МІКС^С-генов в развитии корня охарактеризована слабо. Несмотря на экспрессию генов клады *SOC1* в корне, растения с нулевыми мутациями *agl42*, *soc1*, *agl71*, *agl72*, *agl42-1* *agl19-1* и *agl42-1* *soc1* не меняют структуру корня, что предполагает избыточность функций паралогичных генов. Мутации *xal1* и *xal2* приводят к замедленному росту корней, сверхэкспрессия *XAL1* увеличивает размер АМК, а сверхэкспрессия *ANR1* – длину главного корня (Alvarez-Buylla et al., 2019). ТФ *SOC1* и *AGL24* действуют совместно как репрессоры роста главного корня; их одновременная сверхэкспрессия приводит к значительному укорочению корня (Castañón-Suárez et al., 2024).

Многие гены типа I *Arabidopsis* также экспрессируются в корнях (Parenicová et al., 2003), однако об их участии в развитии корневой системы растения практически нет сведений.

Согласно (Parenicová et al., 2003), гены типа I (отдельные гены M_{α} , M_{γ} и большинство M_{β}) и половина генов типа II (МІКС^С) экспрессируются в листьях *Arabidopsis*. Это предполагает участие данных генов в развитии листьев, что, однако, изучено слабо. Показано, что *AGL16* контролирует образование и раскрытие устьиц и уровень его экспрессии негативно коррелирует с устойчивостью к засухе (Zhao et al., 2020). Повышение экспрессии *AGL79* приводит к сужению листьев и меньшему их количеству, тогда как относительно более низкая экспрессия гена увеличивает число розеточных листьев и боковых побегов *Arabidopsis* (Gao et al., 2018). *MADS-box* гены *SOC1*, *AGL24*, *SVP*, *FLC*, *FT* и др. участвуют в переходе растения от вегетативного роста к репродуктивной фазе развития (Smaczniak et al., 2012).

1.3.8. *MADS-box* гены и репродуктивное развитие растения

Как говорилось выше (раздел 1.3.6), активация генов *SOC1* и *AGL24* служит сигналом для LFY, который запускает переход АМП в состояние МС (Weigel et al., 1992). Которая затем формирует ЦМ. Идентичность ЦМ определяют избыточно действующие ТФ AP1 и CAL. На поздних стадиях развития ЦМ AP1 и LFY совместно активируют экспрессию генов идентичности органов цветка (Kempin et al., 1995; Liu et al., 2009; Kaufmann et al., 2010). В результате ЦМ образует расположенные концентрическими кругами чашелистики, лепестки, тычинки и плодолистики (рис. 4, 5) (раздел 1.1) (Kaufmann et al., 2010).



Модель ABC(E) описывает закладку органов цветка при комбинаторном действии MADS-ТФ классов активностей А, В, С и Е. Модель «Квартет» постулирует формирование тетрамеров MADS-ТФ для осуществления конкретных функций. Внизу показана предполагаемая модель связывания тетрамеров с CArG-боксами в промоторе гена-мишени, транскрипционными кофакторами и белками ремоделирования хроматина (Smaczniak et al., 2012)

Рисунок 4 – Модели развития цветка ABC(E) и «Квартет»

Почти все ключевые гены идентичности цветковых органов входят в семейство MADS МКС^C-типа и классифицированы по классам генетических активностей А, В, С и Е, работающих в различных комбинациях (в составе тетрамеров), согласно моделям ABC(Е) и «Квартет», о которых говорилось выше (раздел 1.3.2) (рис. 4) (Theißen et al., 2018). Данные гены начинают экспрессироваться в конкретных доменах ЦМ, способствуя дифференцировке клеток соответствующих органов. Белки Е-класса (SEP1–4) действуют в значительной степени избыточно и играют особую роль в качестве медиаторов образования тетрамерных комплексов MADS-доменных ТФ (Honma and Goto, 2001; Smaczniak et al., 2012).

Эволюция генов МКС^C-типа тесно переплетается с развитием механизмов контроля перехода растения от вегетативного состояния к репродуктивной стадии (рис. 5). Примером могут служить гены группы *DAM*, возникшие в результате серии tandemных дупликаций и связанные с состоянием физиологического покоя почек и сезонным цветением деревьев (раздел 1.3.1) (Smaczniak et al., 2012; Schilling et al., 2018). Другой пример – *FLC*-подобные гены, которые контролируются яровизацией и являются репрессорами цветения. Активность генов *FLC* ассоциирована с вариациями сроков цветения и ответа на яровизацию среди экотипов *Arabidopsis* и родственных видов (раздел 1.3.1). Активность генов *FLC*, как и генов *DAM*, связана с регуляцией состояния физиологического покоя почек у древесных видов (Smaczniak et al., 2012; Schilling et al., 2018).

Гены *MADS-box* типа I и типа II идентифицированы во всех основных линиях наземных растений, начиная с многоклеточных водорослей и заканчивая высшими цветковыми видами (Smaczniak et al., 2012). Обнаружено, что по мере усложнения структуры и стратегий жизненного цикла растений значительно увеличивалось количество генов *MADS-box* и разнообразие их функций (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). Большинство основных функций генов МКС^C-типа в значительной степени сохраняется среди цветковых растений, даже с учетом функционально избыточных паралогов (Ciaffi et al., 2011).

События дупликации генов МКС^C-типа сопровождалась суб/неофункционализацией паралогов. В качестве примера можно привести гены С-класса *AG*, *SHP1*, *SHP2* у *Arabidopsis*, и *PLENA* (*PLE*), *FARINELLI* (*FAR*) у *Antirrhinum*, функция которых дифференцировалась по-разному, в зависимости от вида (Liljegren et al., 2000; Smaczniak et al., 2012). Экспрессия генов С-класса ограничена двумя внутренними мутовками цветка, при этом репрессия С-класса в околоцветнике опосредована механизмами, также различающимися у *Arabidopsis* и *Antirrhinum* (Parenicova et al., 2003; Smaczniak et al., 2012).

В ходе эволюции претерпели изменения и взаимодействия MADS-доменных ТФ с ДНК-мишенями и белками-партнерами. Например, гены В-класса *DEF* и *GLO* у *Antirrhinum* (гомологи *AP3* и *PI*, соответственно, у *Arabidopsis*) возникли в результате генной дупликации до

появления покрытосеменных растений (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). DEF и GLO (аналогично гомологам из других видов) образуют гетеродимер, который связывается с ДНК, в том числе с промотором *DEF*, формируя положительную ауторегуляторную петлю (Smaczniak et al., 2012). В то же время у некоторых видов цветковых и голосеменных растений ортологи этих белков обладают способностью гомодимеризоваться; то есть облигатная гетеродимеризация DEF- и GLO-подобных белков возникла в ходе эволюции цветковых растений из-за возможного селективного преимущества перед гомодимерами (Lenser et al., 2009; Smaczniak et al., 2012). Дупликация генов В-класса с последующей функциональной дивергенцией, а также эволюционные изменения паттерна их экспрессии, стали предположительной причиной появления различных типов околоцветника (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018).

Предполагается, что гены классов В и С, вовлеченные в регуляцию идентичности андроцея и гинецея, являлись участниками эволюции однополых цветков (Smaczniak et al., 2012).

Известны некоторые гены МКС^С-типа, которые в ходе эволюции привлекались для участия в развитии соцветия. Примером тому могут служить гены подсемейства *STMADS11* (*SEP*), дупликация и последующая диверсификация функции которых может быть связана с морфологическими особенностями чашелистиков у видов *Solanaceae*, *Antirrhinum* или *Physalis floridana* (Smaczniak et al., 2012).

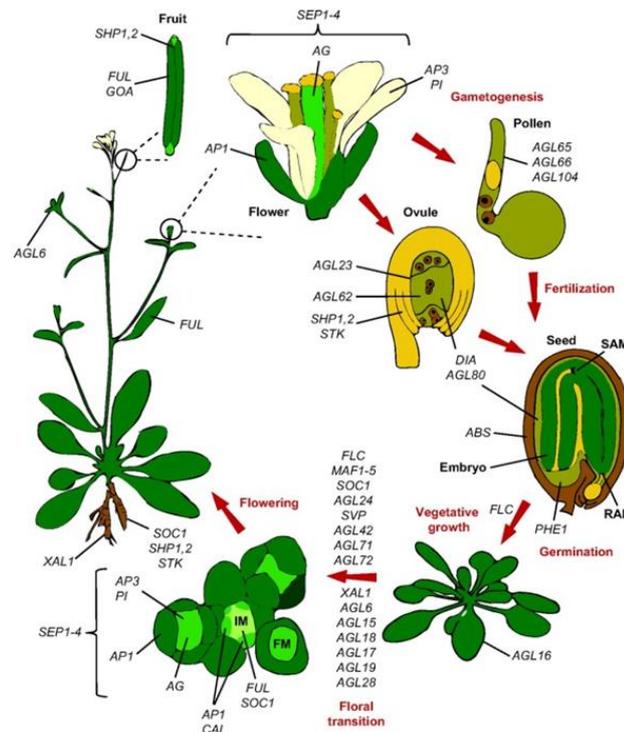
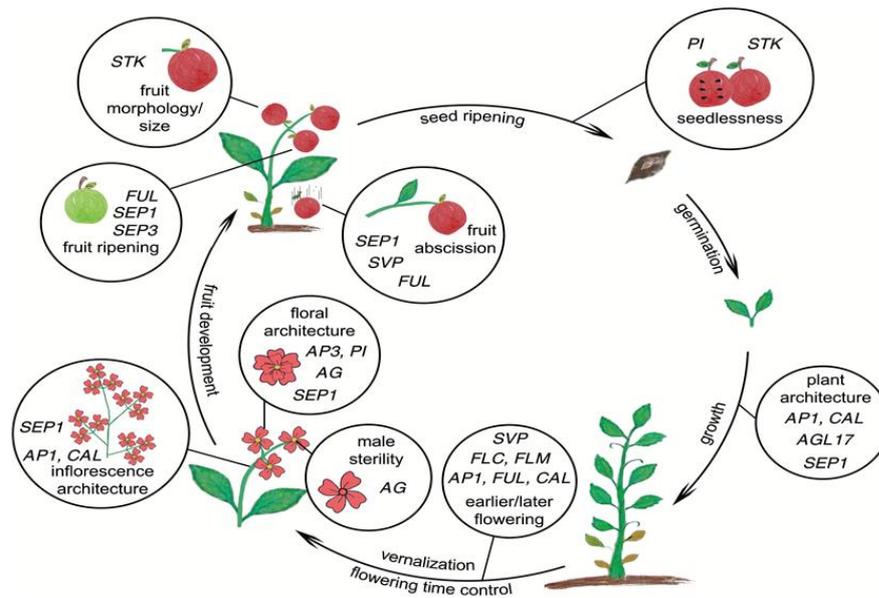
Гены МКС^С-типа также связаны с диверсификацией морфологии плодов и распространения семян. Например, *SHP1* и *SHP2* определяют идентичность перегородки в стручке *Arabidopsis*, а их ортолог *TAGL1* контролирует расширение и созревание сочных плодов томата (Vrebalov et al., 2002; Giménez et al., 2010). Несмотря на то, что плоды бывают разных типов – сухой стручок (*Arabidopsis*), сочный плод-ягода (томат), ложная «ягода» (клубника), в их спецификации задействованы члены одного и того же подсемейства генов МКС^С-типа – *SEP* (Seymour et al., 2013). К примеру, у клубники, от активности гена *FaMADS9* зависит развитие цветоложа и созревание ягод на поздних стадиях развития (Vrebalov et al., 2002; Seymour et al., 2013). У томата подавление функции гена *TM29* приводит к образованию партенокарпических плодов, а ген *RIN* является ключевым регулятором созревания плода (Vrebalov et al., 2002; Seymour et al., 2013). Распространение семян (без участия постороннего фактора) у сухих плодов происходит за счет растрескивания, а у сочных – за счет опадения плода. В регуляции данных процессов задействованы белки подсемейств AP1/FUL и STMADS11 (*SEP*). К примеру, МС (ортолог AP1) контролирует развитие зоны отторжения плода томата на плодоножке путем взаимодействия с J (ортолог STMADS11) с образованием регуляторного комплекса (раздел 1.3.3) (Vrebalov et al., 2002; Nakano et al., 2012).

1.3.9. *MADS-box* гены и образование семян

Дифференцировка клеток плода (стручка) *Arabidopsis* регулируется антагонистически действующими SHP1, SHP2 и FUL (Ferrándiz et al., 2000). При этом размер плода находится под контролем, в частности, МИКС^C-ТФ GORDITA (GOA, подавление клеточного роста) и ARABIDOPSIS BSISTER (ABS; TT16, развитие эндосперма и семян) (Smaczniak et al., 2012). Взаимодействие ABS с белками клады AG опосредовано белками SEP, что указывает на роль тетрамерных комплексов МИКС^C-типа в процессах, выходящих за рамки спецификации цветковых органов (Kaufmann et al., 2010; Smaczniak et al., 2012).

Жизненный цикл растения завершается образованием в процессе мейоза мужских и женских гаплоидных гамет, которые сливаются при оплодотворении, образуя диплоидную зиготу. Показано участие *MADS*-доменных ТФ типов I и II в регуляции нескольких стадий гаметофитного и эмбрионального развития (рис. 5).

MADS-box гены типа I связаны с женским гаметогенезом и развитием семян, что подтверждается экспрессией большинства (38 из 61) из них в тканях гаметофитов и семян (Bemer et al., 2010; Wang et al., 2020). Показано участие генов *AGL80*, *DIANA* (*DIA*; *AGL61*) и *AGL23* в развитии зародышевого мешка, и генов *AGL28*, *AGL80*, *AGL62* (гомолог *DIA*) и *PHERES1* (*PHE1*; *AGL37*) – в развитии эндосперма и семян. Уровень экспрессии генов *PHE1*, *PHE2*, *AGL35*, *AGL36*, *AGL40*, *AGL62* и *AGL90* ассоциируют с переходом эндосперма к клеточной стадии и дифференцировке (Smaczniak et al., 2012; Wang et al., 2020). Белки типа I могут действовать совместно в составе белковых комплексов; к примеру, оба *PHE1* и *PHE2* взаимодействуют с *AGL62*, *AGL28* и *AGL40* (Wang et al., 2020). Таким образом, функции генов типа I связывают преимущественно с регуляцией развития женских гаметофитов и семян.



Жизненный цикл цветкового растения и примеры целевых признаков одомашнивания за счет вариаций *MADS-box* генов (верх) (Schilling et al., 2018). Участие *MADS-box* генов в онтогенезе растения (низ) (Smaczniak et al., 2012)

Рисунок 5 – *MADS-box* гены как мишени селекции и участники онтогенеза растения на примере *Arabidopsis*

Гены типа II клады МІКС* отвечают за образование мужских гаметофитов; мутации в этих генах (например, *agl65*, *agl66* и *agl104*) могут нарушать рост пыльцевых трубок, сроки прорастания и жизнеспособность пыльцы. На роль гена *AGL66* в микроспорогенезе и/или

микрогаметогенезе дополнительно указывает его высокая экспрессия в пыльниках (Wang et al., 2020). Более того, белки AGL65, AGL66 и AGL104 взаимодействуют друг с другом с образованием комплексов, регулирующих динамику транскрипта во время развития пыльцы (Smaczniak et al., 2012; Wang et al., 2020).

Многие гены типа II клады МІКС^C также участвуют в инициации образования и развитии семян. Это, во-первых, гены, отвечающие за саму закладку репродуктивных органов (подсемейства *AP3/PI*, *Bsister*, *AG* и *SEP*) (Smaczniak et al., 2012). В соматическом эмбриогенезе показана стимулирующая роль генов *AGL15* (Joshi et al., 2022) и *AGL18* (Paul et al., 2022).

1.3.10. Гены *MADS-box* МІКС^C-типа и возникновение семян и цветков

Семенные растения произошли от общего предка примерно 300 млн. лет назад и в настоящее время составляют более 90% всех видов наземных видов. Наибольшее разнообразие наблюдается у покрытосеменных растений. Ключевые моменты в их возникновении связывают с появлением семян и репродуктивных органов, и происхождением обоеполых цветков покрытосеменных. Дальнейшие модификации архитектуры соцветия и процесса цветения рассматриваются как важные эволюционные инновации.

Многие подсемейства генов МІКС^C-типа, по-видимому, возникли еще у предковых семенных растений, и основные функции некоторых подсемейств (например, *AG* (класс С), *AP3/PI* (класс В), *Bsister*) сохраняются между покрытосеменными и голосеменными растениями (Theißen et al., 2018). Важность функций и консервативный паттерн экспрессии генов С, В и *Bsister* свидетельствуют в пользу возможной роли этих генов в происхождении андроцея и гинецея (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018).

Следующим важным нововведением в эволюции семенных растений стало возникновение обоеполого цветка у покрытосеменных, где ключевое участие приписывается генам подсемейств *API/FUL* и *SEP* (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). Совокупность событий дупликации генов подсемейств МІКС^C-типа и полного генома у базовых эвдикотов считается основой эволюционного дизайна общей модели цветка (Smaczniak et al., 2012).

1.3.11. Механизмы действия *MADS*-доменных ТФ

В основе молекулярного механизма действия *MADS*-доменных ТФ у растений лежит образование димеров, тетрамеров, связывание белков с консенсусными участками (два CArG-боксы) в промоторе гена-мишени и регуляция его транскрипции (модель «Квартет», рис. 4 в разделе 1.3.8) (Honma and Goto, 2001; Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). В случае наличия только одного CArG-боксы связывание может происходить, но менее стабильно (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018). На примере *Arabidopsis* проведены

крупномасштабные скрининги взаимодействий MADS-доменных ТФ друг с другом и определены возможные димеры, тримеры и тетрамеры (Immink et al., 2010; Smaczniak et al., 2012). Предполагается, что различия в составе комплекса обеспечивает специфичность связывания с конкретной ДНК-мишенью.

Кроме MADS-доменных белков, партнерами в комплексах могут быть ТФ других семейств, корепрессоры и факторы ремоделирования хроматина. Так, SVP, SOC1 и AGL24 взаимодействуют с TFL2, LHP1 и компонентом SAP18 комплекса гистондеацетилазы SIN3 (Liu et al., 2009), а SEP3 – с АТФазами SWI2/SNF2 BRAHMA (BRM) и SPLAYED (SYD) (Smaczniak et al., 2012).

С помощью хроматиниммунопреципитации с последующим секвенированием (ChIP-Seq) обнаружено множество генов-мишеней белков МКС^C-типа. К примеру, под регуляцией FLC находятся гены сигнальных путей абсцизовой кислоты (АБК), что может быть связано с ролью FLC в температурно-зависимом прорастании семян (Chiang et al., 2009; Smaczniak et al., 2012). Среди мишеней SEP3 присутствуют гены ответа на ауксин, что может указывать на участие SEP3 в росте и морфогенезе органов цветка (Kaufmann et al., 2010; Smaczniak et al., 2012).

Кроме того, были получены данные о существовании положительных и отрицательных авторегуляторных петель с участием *MADS-box* генов. Первые важны для стабильной и сбалансированной экспрессии генов-мишеней, тогда как вторые необходимы для переключения фаз развития растения (Smaczniak et al., 2012). Примером могут служить положительная авторегуляция *MADS-box* генов класса В (Lenser et al., 2009) или *AGL24* и *SOC1* (Liu et al., 2008), когда образующиеся белковые димеры активируют транскрипцию своих же генов.

1.3.12. В заключение к главе 1.3

Таким образом, за последние десятилетия было накоплено огромное количество данных о семействе MADS-доменных ТФ, их определяющей роли в разнообразии растений и мультифункциональности. Показано, что почти для каждого MADS-подсемейства характерна функциональная избыточность составляющих его паралофов. Гены *MADS-box* изучены у множества видов растений, включая важные сельскохозяйственные культуры, такие как, к примеру, томат (*S. lycopersium*), баклажан (*S. melongena*) (Wang et al., 2019), перец (*Capsicum annuum*) (Gan et al., 2022), виноград (*V. vinifera*) (Grimplet et al., 2016), рис (*O. sativa*) (Aroga et al., 2007). Результаты исследований свидетельствуют о высокой меж- и внутривидовой структурно-функциональной консервативности семейства *MADS-box*, а также выявляют видовые особенности функций отдельных генов.

1.4. Семейство ТФ YABBY: эволюция и развитие растений

Не менее значимо для развития растений, чем MADS-доменные белки, семейство ТФ YABBY (Finet et al., 2016). Предполагается, что дубликации предшественников генов YABBY с последующей диверсификацией привели к возникновению плоского листа из радиально-симметричных структур (Bartholmes et al., 2012). В селекции изучение механизмов установления дорсовентральной (абаксиально-адаксиальной) полярности латеральных органов занимает важное место, поскольку это необходимо для понимания механизмов роста, развития и определения хозяйственно-ценных признаков (Zhang et al., 2020a).

Гены YABBY найдены только у растений отделов Голосеменные и Покрытосеменные. Представители семейства YABBY были идентифицированы и изучены у различных видов растений, таких как *A. thaliana*, рис, томат, пшеница, подбельник и другие (Zhang et al., 2020a). Показано, что ТФ YABBY играют значимую роль в процессах расширения листьев, развитии репродуктивных органов, установления полярности, а также фитогормональных и стрессовых реакциях (Hou et al., 2019; Zhang et al., 2020a).

Характеристика семейства YABBY у модельного вида *A. thaliana* классифицировало гены по подсемействам, различающимся структурой и функцией. Гены YABBY 1 (YAB1, или *FILAMENTOUS FLOWER*, *FIL*) и YAB3 составили подсемейство *FIL*, члены которого экспрессируются в клетках абаксиальных поверхностей всех надземных органов. Сходный с *FIL* профиль экспрессии имеют гены YAB2 и YAB5, образующие второе и третье подсемейства. Два оставшихся гена играют ограниченные, тканеспецифичные роли и формируют еще два подсемейства. Это гены YAB4 (или *INNER NO OUTER*, *INO*) и *CRABS CLAW* (*CRC*), функционирующие в наружном покрове семязачатка и абаксиальных клетках плодолистика, соответственно (Zhang et al., 2020a). Сверхэкспрессия генов YABBY приводит к установлению абаксиальной идентичности в адаксиальном домене, тогда как отсутствие активности генов дает противоположный эффект (Zhang et al., 2020a).

В отличие от двудольных видов, у однодольных растений транскрипты YABBY присутствуют и в адаксиальных клетках листа, что показано, к примеру, на кукурузе (Zhang et al., 2020a). Поэтому было выдвинуто предположение, что наследственная функция генов YABBY заключается не в определении полярности листа, а в стимуляции роста его ламины (Zhang et al., 2020a). Однако ТФ YABBY продолжают относить к факторам полярного развития органов совместно с другими известными белками, такими как ТФ семейства HD-ZIP III, которые регулируют транскрипцию генов YABBY видоспецифичным образом (Zhang et al., 2020a).

Белки семейства YABBY характеризуются наличием консервативного домена YABBY, состоящего из двух субдоменов helix-loop-helix (HLH) и C2C2 (домен цинковых пальцев), и

могут взаимодействовать друг с другом, а также с ТФ других семейств (Zhang et al., 2020a). В то время, как у двудольных семейство состоит из пяти подсемейств, у однодольных их всего четыре (отсутствует YAB5) (рис. 6) (Zhang et al., 2020a). В зависимости от подсемейства, белки YABBY имеют свои консервативные структурные мотивы, характерные для каждого подсемейства (Bartholmes et al., 2011).

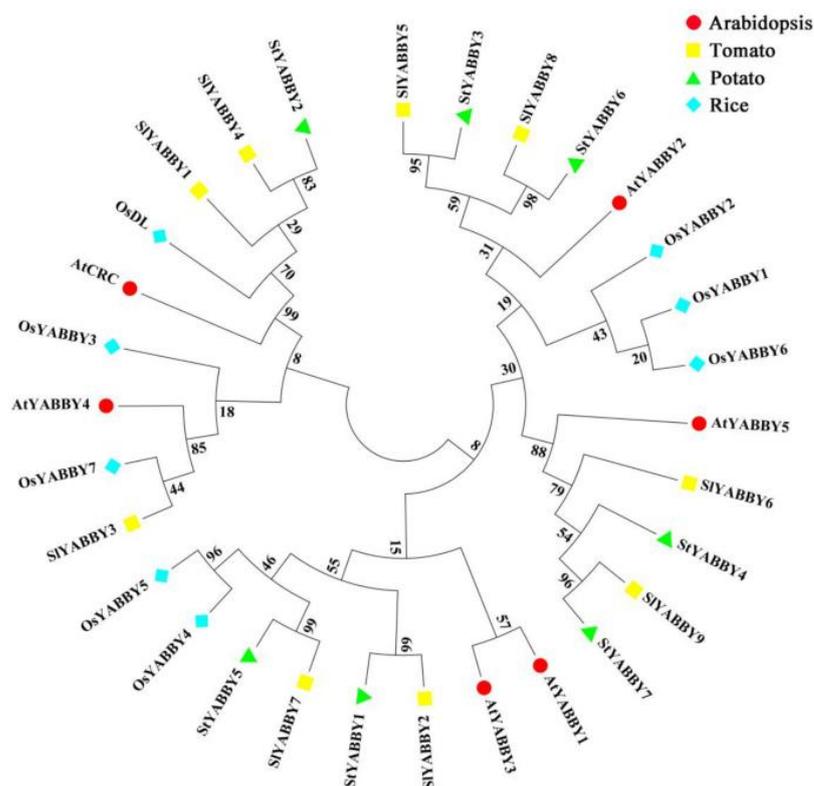


Рисунок 6 – Филогения ТФ YABBY у *Arabidopsis*, томата, картофеля и риса (Zhang et al., 2020a)

1.4.1. ТФ YABBY и адаксиально-абаксиальная полярность органов

Как уже говорилось, клетки АМП дают начало надземным органам растения (стебли, листья и цветки) (раздел 1.1), которые характеризуются абаксиально-адаксиальной полярностью (Finet et al., 2016). Следствием асимметрии листа является его плоская структура (пластина), где клетки верхней и нижней поверхности различаются своими свойствами. Идентичность абаксиальных клеток находится в зависимости от активности генов YABBY (Zhang et al., 2020a). Верхняя сторона листа предназначена для улавливания света, а нижняя — для газообмена (Xiong and Jiao, 2019), и взаимодействие между адаксиальными и абаксиальными клетками способствует разрастанию пластины (Zhang et al., 2020a).

Как говорилось выше, гены *FIL*, *YAB3*, *YAB2* и *YAB5* экспрессируются в надземных вегетативных органах *Arabidopsis* и связаны не только с судьбой клеток абаксиального домена, но и с поддержанием АМП (Nurani et al., 2020). Мутация *fil* приводит к формированию нитевидных органов вместо листьев, другим морфологическим дефектам и частичной потере

идентичности меристемы побега. Двойная мутация *fil yab3* приводит к полному нарушению развития АМП и пазушных меристем листьев. Сверхэкспрессия генов *FIL* или *YAB3* приводит к формированию в адаксиальном домене клеток с абаксиальной идентичностью и, как следствие, к скручиванию листьев. Тройная (*fil yab3 yab5*) и четверная (*fil yab2 yab3 yab5*) мутации вызывают формирование радиально-симметричных листьев и радиальных соцветий, которые теряют адаксиальные или абаксиальные домены (Zhang et al., 2020a). Кроме того, *YAB3* может контролировать судьбу сосудистых клеток путем негативной регуляции дифференцировки ксилемы в абаксиальном слое (Nurani et al., 2020).

Аналогично, эктопическая экспрессия гена *GmFILa* (*Glycine max*) в растениях *Arabidopsis* вызывает частичную абаксиализацию адаксиального эпидермиса листьев, более продолжительное цветение и сдерживание развития АМП (Yang et al., 2019). На примере модельного вида *A. majus* подтверждено, что *GRAMINIFOLIA* (*FIL/YAB3*) и *PROLONGATA* (*YAB5*), участвуют в росте и установлении асимметрии листьев (Zhang et al., 2020a).

Исследования на винограде (*V. pseudoreticulata*) продемонстрировали расхождение функции генов *YAB2* и *FIL/YAB3*. Ген *VpYABBY1* (гомолог *FIL*) экспрессируется в молодых и зрелых листьях, тогда как *VpYABBY2* (*YAB2*) – в стеблях, листьях и цветках винограда. Эктопическая экспрессия *VpYABBY1* у *Arabidopsis* приводит к частичной абаксиализации адаксиальных клеток листа, тогда как сверхэкспрессия *VpYABBY2* не вызывает каких-либо изменений. Авторы исследования предполагают, что *VpYABBY1* участвует в развитии листьев, тогда как *VpYABBY2* – в развитии плодолистика и морфогенезе ягод (Xiang et al., 2013).

Интересно в связи с этим упомянуть *YAB2*-ген томата *FASCIATED* (*FAS*), отсутствие активности которого приводит к образованию многокамерных плодов (Finet et al., 2016; Zsogon et al., 2018). Геном *S. lycopersicum* содержит два гена клады *YAB2* – *SIYAB2* и *SIFAS* (Han et al., 2015; Slugina et al., 2020c), что предполагает более позднее происхождение *SIFAS* и его решающую роль в доместикации томата, направленной на увеличение размера плодов (van der Knaap et al., 2014).

Ген *CRC* необходим для корректного полярного развития плодолистика и терминации развития ЦМ (Gross et al., 2018). *CRC* считается основным геном, участвующим в инициации и формировании нектарников, но эктопической экспрессии *CRC* недостаточно, чтобы индуцировать эктопические нектарники. Сверхэкспрессия *CRC* в листьях и лепестках стимулирует абаксиализацию адаксиального домена; мутация *crc* не приводит к изменению полярности плодолистика, но в абаксиальных областях плодолистиков *crc kanadi1* могут развиваться адаксиальные структуры (Zhang et al., 2020a).

Ген *INO* специфически экспрессируется на одной стороне центральной области примордия каждого семязачатка, регулируя развитие внешнего интегумента и, таким образом,

играя решающую роль в развитии семязачатков у *Arabidopsis*. В ходе развития семязачатка ТФ SUPERMAN (SUP) отрицательно регулирует ген *INO*, ограничивая его экспрессию базальной стороной пестика (Gasser and Skinner, 2019). Мутации в гене или промоторе *INO* нарушают структуру семязачатка или вовсе отменяют его образование (Zhang et al., 2020a). В подтверждение роли *INO* в развитии внешнего интегумента и избыточности функций генов *YABBY* показано, что экспрессия *YAB3* или *CRC* под контролем промотора гена *INO* восстанавливает формирование внешнего интегумента в растениях с мутацией *ino*. Однако полностью восстановить морфологию интегумента способен только ген *INO*. Наличие внешнего интегумента критично, поскольку будущая оболочка семян поддерживает их жизнеспособность (Filyushin et al., 2019).

Исследования семейства *YABBY* злаковых засвидетельствовали консервативность функций генов *YABBY* между двудольными и однодольными видами и определили некоторые различия, в особенности для генов подсемейств *INO* и *CRC*. С учетом полиплоидии злаковых культур число генов семейства *YABBY* выше, чем у эвдикотов. Так, в геноме пшеницы присутствует 20 генов *YABBY*, классифицированных по кладам *FIL*, *YAB2*, *INO* и *CRC*; многие из 20 генов высоко экспрессируются в листьях и регулируются абиотическими стрессовыми факторами (Hao et al., 2022). В растениях риса (*O. sativa*) ген подсемейства *CRC* – *DROOPING LEAF* (*DL*) регулирует формирование плодолистика и средней жилки листа. Мутации потери функции *dl* вызывают гомеотическую трансформацию плодолистиков в тычинки и поникание листа из-за отсутствия средней жилки (Zhang et al., 2020a). При этом, как упоминалось выше, *CRC* у *Arabidopsis* играет роль в слиянии и росте плодолистиков, терминации развития ЦМ и активации закладки нектарников (Gross et al., 2018). Таким образом, гены клады *DL/CRC* могли функционально дивергировать в ходе эволюции покрытосеменных растений. Профиль экспрессии *DL*-генов у представителей сем Злаковые (Poaceae) идентичен, что говорит о консервативности *DL*-функции в семействе (Zhang et al., 2020a).

1.4.2. В заключение к главе 1.4

Семейство ТФ *YABBY* специфично для высших растений. Его члены выполняют консервативные функции, но имеют особенности, различающие их у однодольных и двудольных видов. Роль ТФ *YABBY* обладает потенциалом в области селекции сельскохозяйственных культур, направленной на характеристики плода, стрессовую адаптацию, увеличение урожайности и другое. Такому использованию будут способствовать межвидовые исследования специфических особенностей функций ТФ *YABBY*.

1.5. MADS- и YABBY-доменные ТФ в ответе растений на стрессовые факторы

Растения привязаны к месту произрастания, поэтому вынуждены приспосабливаться к любому неблагоприятному изменению условий окружающей среды (засуха, повышенная влажность, избыток соли или токсичных металлов в почве, экстремальные температуры, дефицит питательных веществ). В случае сельскохозяйственных культур подобные явления способны значительно снизить урожайность и качество продукции.

Абиотические факторы влияют на многие аспекты морфофизиологических и клеточных процессов в растении и приводят к целому спектру последствий – от критического ущерба до адаптивных реакций, которые восстанавливают повреждения и баланс клеточного гомеостаза и приспособляют растение к данным конкретным условиям (Zhang et al., 2020b).

Молекулярные механизмы стрессового ответа и адаптации растений носит многоуровневый характер и включает дифференциальную транскрипцию множества генов и трансляцию/посттрансляционные модификации их белковых продуктов. Знания, получаемые в процессе исследования данных механизмов, могут быть использованы в селекции стрессоустойчивых высокопродуктивных сортов (Bailey-Serres et al., 2019).

1.5.1. MADS-доменные ТФ в стрессовом ответе

В ответ на стрессор растение активирует соответствующие сигнальные каскады, которые корректируют работу различных метаболических путей, индуцируя внутренние реакции выживания и адаптации. Ключевыми регуляторами реакции на стрессовые факторы и сезонные колебания окружающих условий являются ТФ, важное место среди которых занимает семейство MADS-доменных ТФ (Castelán-Muñoz et al., 2019). Как говорилось выше (раздел 1.2), данные белки участвуют во множестве процессов развития, а кодирующие их гены могли быть мишенью в процессе доместикации растений и основной причиной эволюционных инноваций в их развитии и морфологии (Smaczniak et al., 2012).

Способность MADS-доменных ТФ контролировать самые разные программы развития объясняется тем, что работают они в виде мультимерных комплексов, состав которых меняется в зависимости от задачи (Smaczniak et al., 2012), и регулируют транскрипцию тысяч генов-мишеней (Kaufmann et al., 2010).

При абиотическом стрессе возрастает количество активных форм кислорода (АФК), что приводит к окислительному стрессу, справиться с которым клеткам помогают антиоксидантные соединения, к которым относятся каротиноиды, флавоноиды, глутатион, аскорбат, а также антиоксидантные ферменты (каталазы, пероксидазы, др.) (Choudhury et al., 2017).

Дефицит воды может быть вызван как засухой, так и холодом и избытком соли. Интеграция сигналов осмотического стресса и противостояние ему осуществляется с ключевым участием фитогормона АБК, поэтому при анализе биохимического ответа растений всегда наблюдается изменение содержания АБК. При этом при воздействии всех трех факторов включается сходный механизм ответа, который включают не только АБК-зависимые, но и АБК-независимые сигнальные пути (Yoshida et al., 2014).

На примере риса (*O. sativa*) как одной из самых важных сельскохозяйственных культур показано, что в ответ на засуху увеличивается уровень экспрессии *MADS-box* гена *OsMADS26* (ортолог *AGL12*) (Khong et al., 2015), что предполагает роль данного гена в определении устойчивости риса к засухе. Однако сверхэкспрессия *OsMADS26* у риса и *Arabidopsis* приводила к низкой жизнеспособности растений (снижение роста корней/побегов, стерильность, скручивание корней, дефицит хлорофиллов), что совпадало с фенотипом контрольных растений при засухе (Lee et al., 2008). В случае потери функции *OsMADS26* реакция растений на засуху ничем не отличалась от реакции растений дикого типа (Lee et al., 2008). В другой работе сверхэкспрессия *OsMADS26*, напротив, не вызывала серьезных фенотипических отклонений в растениях, тогда как потеря функции гена сопровождалась повышением биомассы, урожайности и устойчивости к засухе (Khong et al. 2015). В поддержку роли гена в ответе на засуху было показано, что ТФ *OsMADS26* положительно регулирует многие гены, связанные со стрессом, включая гены ферментов гомеостаза АФК, такие как НАДФН-оксидаза, пероксидаза и оксидоредуктазы (Lee et al., 2008). Согласно статье оппонентов, *OsMADS26* негативно регулирует гены, связанные с устойчивостью к засухе (*OsRAB21*, *RESPONSIVE TO ABA 21*), соли (*ALT STRESS-INDUCED PROTEIN*) и АФК (*ROS scavenging enzyme Peroxidase 22*) (Khong et al. 2015). При всей неоднозначности данных можно говорить об участии *OsMADS26* в реакции растений на засуху, и для получения трансгенного риса, устойчивого к засухе, необходима настройка пространственно-временного паттерна и уровня экспрессии *OsMADS26*.

Еще один *MADS-box* ген риса *OsMADS57* (подсемейство *AGL17*) вовлечен в ответ растения на низкие температуры, засуху и засоление; более того его сверхэкспрессия способствует выживанию растений в условиях холода (Arora et al., 2007; Chen et al., 2018).

В реакции *A. thaliana* на засуху участвует ТФ *SVP*, выключение которого приводит к еще большей потере воды в условиях засухи и который регулирует экспрессию ряда генов, ассоциированных с ответом на засуху (например, *DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A* и *FLOWERING BHLH 3*) (Bechtold et al., 2016). Предполагается, что *SVP* действует как положительный регулятор засухоустойчивости; мутация *svr* повышает чувствительность к засухе, в то время как линии со сверхэкспрессией гена устойчивы. Показано, что *SVP* подавляет

экспрессию *CYP707A1* и *CYP707A3* (гены 8-гидроксилазы АБК), которые участвуют в катаболизме АБК в листьях, и активирует *AtBGL1* (ген β -глюкозидазы), участвующий в гидролизе АБК-глюкозильного эфира до АБК, что является важным этапом для накопления активной формы фитогормона (Bechtold et al., 2016).

Солевой стресс, обезвоживание и поранение индуцируют у растений томата экспрессию *MADS-box* гена *SIMBP11* (ортолог *AGL15*). Выключение гена повышает чувствительность к избытку соли, что сопровождается снижением сырой массы, содержания хлорофиллов и роста корней. Сверхэкспрессия *SIMBP11* придает устойчивость к солевому стрессу; такие линии накапливают большее количество хлорофиллов и меньшее малонового диальдегида (маркера оксидативного стресса). Ген *SIMBP8*, являющийся близким гомологом *SIMBP11*, оказывает прямо противоположное влияние на соле- и засухоустойчивость томатов (Guo et al., 2016).

В растениях перца ген *CaMADS* (клада *AGL2/SEP1*) индуцируется различными стрессовыми условиями. Подавление этого гена у перца приводит к повышенной чувствительности к холоду и осмотическому стрессу. Сверхэкспрессия *CaMADS* у *A. thaliana* повышает устойчивость к тем же факторам и способствует лучшему восстановлению растений после воздействия холода (Chen et al., 2019).

По крайней мере, 50 из 107 *MADS-box* генов *A. thaliana* экспрессируются в корнях (Parenicova et al., 2003), но степень их участия в реакции корня на абиотический стресс охарактеризована слабо. Показано участие *MADS-box* генов в реакции растений на дефицит микроэлементов, в частности, фосфора (P), содержание которого важно для архитектуры корневой системы. К примеру, у пшеницы девять из 54 генов *MADS-box* по-разному регулируются в условиях P-депривации, и сверхэкспрессия одного из них положительно влияет на урожайность и повышает антиоксидантную активность при дефиците P (Castelán-Muñoz et al., 2019). *MADS-box* ген *GbMADS9* (*Ginkgo biloba*, клада Bsister) участвует в устойчивом развитии корней при абиотическом стрессе (избыток соли, засуха, холод). Суперэкспрессия *GbMADS9* у *A. thaliana* в условиях осмотического стресса способствует удлинению корней, накоплению в листьях хлорофиллов и пролина (как осмолита, хелатора металлов, антиоксиданта), а также повышению активности супероксиддисмутазы и каталазы (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Кроме того, показано участие *MADS-box* генов в ответе растений на изменение концентраций азота в почве, сопровождающееся преобразованием архитектуры корневой системы. К примеру, *MADS-box* ген *ANR1/AGL44* хорошо известен как положительный регулятор развития боковых корней в ответ на доступность нитратов (Alvarez-Buylla et al., 2019). Выключение *ANR1* приводит к остановке удлинения боковых корней при стимулирующем воздействии высоких концентраций азота, а его сверхэкспрессия – к

повышению плотности и большей длине боковых корней и в нормальных условиях, и при высоком содержании азота (Castelán-Muñoz et al., 2019). Сверхэкспрессия у *A. thaliana* одного из пяти ортологов *ANR1* риса, *OsMADS25*, индуцирует образование боковых корней, удлинение главного и боковых корней, а также увеличение сырой массы корней и побегов в отсутствие азота и с усилением эффекта при его добавлении. Сверхэкспрессия *OsMADS25* в растениях риса приводит к удлинению главного и боковых корней, тогда как его замалчивание – к укорочению (Wu et al., 2023). Более того, сверхэкспрессия *OsMADS25* у риса повышает холодостойкость растений (Yan et al., 2021).

Другой пример, ген *AGL21*, который экспрессируется в сосудистой ткани главного корня *A. thaliana* и в зачатках боковых корней, и индуцируется различными стрессорами и фитогормонами. Линии со сверхэкспрессией *AGL21* производят большее количество и более длинные боковые корни и при дефиците, и при избытке азота; нулевая мутация с потерей функции гена дает обратный эффект (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Гены *MADS-box* как ключевые регуляторы развития цветка вовлечены и в морфологические изменения репродуктивных тканей в ответ на стрессоры. К примеру, цветки томата при низких температурах характеризуются изменением идентичности органов, их количества, характера их слияния, или комбинацией всех трех фенотипических проявлений. При этом индуцируется экспрессия некоторых генов *MADS-box*, включая *TOMATO APETALA 3 (TAP3)* (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Температура влияет также на фертильность цветка, в частности, на развитие и функционирование мужских гаметофитов (пыльцевых зерен) (Müller et al., 2016). Поскольку идентичность тычинок определяется комплексом *MADS*-доменных ТФ классов В (*AP3*, *PI*), С (*AG*) и Е (*SEP*) (Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2018), можно предположить участие данных четырех белков в морфологических изменениях тычинок, вызванных стрессом. Так, в умеренно жарких условиях *S. lycopersicum* образует тычинки с множеством различных фенотипов, включая потерю жизнеспособности пыльцы и превращение пыльников в пестикоподобные структуры, при этом в пыльниках снижается экспрессия генов В-активности (*TAP3*, *TM6* и *LePI*) (Müller et al., 2016). Замалчивание *TM6* при нормальной температуре слабо нарушает идентичность пыльников, а при повышенной температуре вызывает их сильную деформацию и уменьшение количества фертильной пыльцы (Müller et al., 2016).

Другой пример – ген *OsMADS3* риса (ортолог *AG*), который экспрессируется в тапетуме и микроспорах на поздней стадии развития пыльника. Мутация *osmads3-3* приводит к гомеотической трансформации тычинок в лодикулы, а *osmads3-4* – к мужской стерильности из-за дефектов в развитии пыльцы (Castelán-Muñoz et al., 2019).

С активностью *MADS-box* генов связывают регуляцию развития семян в стрессовых условиях. Так, у *Arabidopsis* ген *AGL21*, помимо своей роли в развитии боковых корней, действует как негативный регулятор прорастания семян в условиях осмотического стресса (Yu et al. 2017). Сверхэкспрессия *AGL21* изменяет скорость прорастания, и семена становятся гиперчувствительными к избытку соли, тяжелому осмотическому стрессу и обработке АБК. Выключение *AGL21* смягчает стрессовый эффект на скорость прорастания семян в сравнении с семенами дикого типа. Показано, что ТФ *AGL21* участвует в передаче сигналов АБК, напрямую регулируя экспрессию гена *ABA INSENSITIVE 5 (ABI5)* (Yu et al. 2017). Еще один ген *Arabidopsis*, вовлеченный в развитие семян – *AGL15*, сверхэкспрессия которого задерживает созревание стручка и высыхание семян (Castelán-Muñoz et al., 2019).

В растениях риса несколько генов *MADS-box* типа I участвуют в раннем формировании семян и определяют их размер (Castelán-Muñoz et al., 2019). Уровень экспрессии *OsMADS82*, *OsMADS87* и *Os11g30220* в семенах снижается в жарких условиях, что сопровождается уменьшением размера и жизнеспособности семян (Chen et al., 2016). Снижение экспрессии *OsMADS87* ускоряет целлюляризацию эндосперма и уменьшает размер семян в нормальных условиях выращивания; сверхэкспрессия *OsMADS87* не изменяет целлюляризацию, но дает более крупные семена по сравнению с семенами дикого типа. При этом в условиях теплового стресса и трансгенные линии, и линии дикого типа формируют семена меньшего размера по сравнению с контролем (Chen et al., 2016).

Переход растения к репродуктивному развитию, находящийся под регуляцией *MADS-box* генов (Whittaker and Dean, 2017), подвержен влиянию внешних условий (фотопериод, качество света, др.) и различных стрессоров (засуха, температура, окислительный и солевой стрессы) (Castelán-Muñoz et al., 2019). Одним из основных морфологических изменений покрытосеменных во время засухи является ранний переход к репродуктивной фазе. У *Arabidopsis* такая реакция контролируется фотопериодом: цветение запускается в условиях долгого дня и репрессируется при коротком дне (Riboni et al., 2016). Данные реакции зависят от уровня экспрессии генов *SOC1*, *FLC* и *SVP*, а также от содержания АБК (мутанты по биосинтезу АБК цветут позже, чем дикий тип). Экспрессия *SOC1* индуцируется засухой при коротком дне АБК-зависимым образом. При долгом дне растения с *soc1-2* мутацией слабо реагируют на засуху и поздно цветут; при коротком дне реакция сильно зависит от репрессорной активности комплекса *FLC/SVP*. В условиях однодневной засухи мутанты *svp-41* с потерей функции цветут раньше, а *flc-6* не меняют сроки цветения (Riboni et al., 2016).

Сверхэкспрессия гена *MADS-box AGL15* приводит к позднему цветению, при этом известно, что ТФ *AGL15* негативно регулирует экспрессию гена *PRX17*, а также активность

кодируемого им фермента – пероксидазы класса III – антиоксиданта, используемого в борьбе с окислительным стрессом (Cosio et al., 2017).

Низкотемпературный или холодовой стресс связан с кратковременным охлаждением (0°C – 10°C) или замерзанием ($<0^{\circ}\text{C}$), когда растения после снятия воздействия характеризуются хлорозом и снижением роста листьев, изменением срока цветения (Barah et al., 2013). На молекулярно-генетическом уровне происходит активация сигнального пути, начиная с транскрипционного комплекса ICE-CBF-COR, который регулирует экспрессию более 100 генов, включая гены *MADS-box*. ТФ *SOC1* подавляет экспрессию генов *COR* и *CBF*, ТФ *CBF* активируют гены *COR* и *FLC*, что приводит к задержке цветения, но повышает холодостойкость (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Еще один пример – *MADS-box* гены *SVP* и *FLOWERING LOCUS M (FLM, MAF1, AGL27)*, которые негативно регулируют экспрессию *FT* и переход к цветению в условиях низких положительных температур у *Arabidopsis*. *FLM* имеет несколько вариантов альтернативного сплайсинга, в зависимости от температуры и экотипа, и эти варианты могут действовать прямо противоположным образом на время цветения (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Как говорилось выше, многим растениям требуется яровизация, чтобы оптимизировать время цветения. У *Arabidopsis* яровизация индуцирует эпигенетическое замалчивание *FLC*, который в норме репрессирует переход к цветению, подавляя экспрессию генов цветения *FT* и *SOC1* (Sung and Amasino, 2005; Whittaker and Dean, 2017). Выше упомянутые ТФ *CBF* индуцируют экспрессию *FLC*, что может объяснить задержку цветения при пониженных температурах. Однако механизмы цветения растений, задействующие *CBF* и *FLC*, в ответ на краткий и длительный (яровизация) холодовой стресс различаются (Castelán-Muñoz et al., 2019). В геноме *Arabidopsis* присутствуют пять генов *MAF1-5* (паралогов *FLC*), которые регулируются яровизацией (кроме *MAF4*): *MAF5* активируется, а *FLM (MAF1)*, *MAF2* и *MAF3* репрессируются (De Bodt et al., 2003; Castelán-Muñoz et al., 2019). Подобный ответ на продолжительный холод поддерживается у злаков умеренного пояса (пшеница, ячмень). Только в данном случае это уже не *FLC*, а *MADS-box* гены группы *VRN1*, которые являются индукторами цветения в отличие от *FLC* (Trevaskis et al., 2003). Уровень экспрессии *VRN1* у растений при выходе из яровизации высокий у озимых злаковых и низкий у яровых (Trevaskis et al., 2003).

Температурные перепады влияют и на состояние физиологического покоя почек у многолетних растений, выход из которого, кроме возобновления клеточного деления и изменения программ развития, требует определенного периода низких температур (Liu et al., 2015). Данный процесс имеет сходство с механизмом цветения при яровизации (Considine and Foyer, 2014). Уже упомянутые *MADS-box* гены группы *DAM*, которые являются ортологами *SVP* и *AGL24* из *Arabidopsis*, вовлечены в регуляцию выхода почек из покоя у древесных растений

(Schilling et al., 2018). Делеция всех шести генов *DAM* у персикового дерева провоцирует постоянный рост терминальных меристем в зимних условиях, а сверхэкспрессия этих генов способствует карликовости, ветвистости и переходу в состояние покоя без необходимости (Sasaki et al., 2011; Schilling et al., 2018). На состояние покоя почек, связанное с охлаждением, по некоторым данным, также влияет активность и других *MADS-box* генов – ортологов *FUL* и *SOCI* (Schilling et al., 2018; Castelán-Muñoz et al., 2019).

Таким образом, гены *MADS-box* являются регуляторами не только множества аспектов развития растения, но и участвуют в определении стрессоустойчивости и адаптивности. Данные функции считаются высоко консервативными среди видов растений. Многие механизмы, с помощью которых гены *MADS-box* координируют транскрипционный ответ на стрессоры, еще предстоит детализировать или идентифицировать. Сюда входит, в числе прочего, регуляция метаболизма, как первичного, так и вторичного, а также процессов гомеостаза АФК.

Так, показано, что *MADS-box* ген *RIN* участвует в созревании плода томата посредством регуляции транскрипции генов биосинтеза различных метаболитов (углеводов, этилена, каротиноидов, АБК, др.) (Vrebalov et al., 2002; Fujisawa et al., 2013; Dong et al., 2014; Li et al., 2018). При сверхэкспрессии гена *RIN* плод томата созревает быстрее и характеризуется накоплением большего, чем в норме, количества каротиноидов; выключение гена *RIN* приводит к обратному эффекту (включая задержку созревания и зеленую окраску плода), так же, как и выключение другого *MADS-box* гена томата клады *SEP* – *SICMB1* (Zhang, et al. 2018). Показано, что в растениях с выключенной функцией генов *SEP* изменяется экспрессия генов биосинтеза каротиноидов и других *MADS-box* генов томата, имеющих отношение к созреванию плода (Zhang, et al. 2018).

Фитогормон АБК, который принимает участие практически во всех процессах развития растения и стрессовых ответах, является апокаротиноидом, производным β, β -ветви биосинтеза, и, таким образом, опосредованно находится под регуляторным контролем *MADS-box* генов. К примеру, показано, что выключение гена *AGL16* придает растениям солеустойчивость, что объясняется усилением экспрессии генов, участвующих в передаче сигналов АБК; сверхэкспрессия *AGL16* дает противоположный эффект (Zhao et al., 2021). У растений риса активность гена *OsMADS23* связывают с устойчивостью к засухе и избытку соли за счет регуляции биосинтеза АБК (Li et al., 2021).

Имеются данные и о зависимости углеводного метаболизма от экспрессии *MADS-box* генов. На примере томата показано, что накопление углеводов в плоде значительно изменяется в ответ на сверхэкспрессию гена *SIAGL11* (ортолог *STK*) (Huang et al., 2017). Выключение гена *OsMADS14* (ортолог *FUL*) в рисовых зернах снижает количество крахмала и нарушает строение крахмальных гранул (Feng et al., 2022). Альтерация экспрессии двух других *MADS-box* генов

риса – *MADS78* и *MADS79*, также изменяет углеводный метаболизм за счет нарушения регуляции генов биосинтеза крахмала, что вызывает структурные аномалии в крахмальных гранулах при созревании зерна (Paul et al., 2020). Еще одним примером является участие ТФ MaMADS36 в определении содержания крахмала и сахаров в процессе созревания плода банана посредством регуляции транскрипции генов деградации крахмала (Liu et al., 2021).

1.5.2. Участие ТФ YABBY в реакции на фитогормоны и стрессовые факторы

Исследования функции генов *YABBY* свидетельствуют об их роли в ответе растений на фитогормоны и стрессовые факторы. К примеру, ген *OsYAB1* участвует в регуляции биосинтеза и накопления гиббереллиновых кислот (GA) в растениях риса (Dai et al., 2007). Сверхэкспрессия *OsYAB1* в трансгенных линиях риса приводит к полукарликовому фенотипу, который восстанавливается до нормы при внешней обработке GA. Обнаружено, что ТФ *OsYAB1* может связываться с GA-чувствительным элементом в промоторе гена *GA3ox2*, влияя на регуляцию биосинтеза GA по принципу обратной связи (Dai et al., 2007). Сверхэкспрессия гена *OsYAB4* приводит к полукарликовому фенотипу, аномальному развитию самого верхнего междоузлия и увеличению количества органов цветка. Показано, что ТФ *OsYAB4* связывается с промоторными областями генов *GA20ox2* и *SLR1*, подавляя их экспрессию; избыточное накопление *OsYAB4* ингибирует GA-зависимую деградацию белка SLR1 (Yang et al., 2016).

Анализ промоторов генов *YABBY* у *M. domestica* и *B. rapa* обнаружил целый ряд цис-регуляторных элементов, связанных с реакцией на стресс и гормональными сигнальными путями. Это является косвенным подтверждением участия ТФ *YABBY* в онтогенезе и стрессоустойчивости растений (Li et al., 2012; Shao et al., 2017). На примере сои продемонстрировано участие некоторых членов семейства *YABBY* (*GmYABBY3*, *GmYABBY10* и *GmYABBY16*) в реакциях на засуху, соль и АБК, что говорит о роли ТФ *YABBY* в регуляции устойчивости растений (Zhao et al., 2017). Характер экспрессии генов семейства *YABBY* у хлопка продемонстрировал, что активность примерно половины из них подавляется различными стрессорами (Yang et al., 2018). У томата ТФ *SlYABBY2b* напрямую связывается с промотором гена *GH3.8*, участвуя в опосредованной ауксином репрессии *GH3.8* и, тем самым, регулируя высоту растения (Sun et al., 2020).

Известны факты участия генов *YABBY* в регуляции метаболизма жирных кислот у *Arabidopsis*. Показано, что ТФ CRC может связываться с промоторами *KCS7* и *KCS15*, тем самым напрямую регулируя биосинтез жирных кислот с очень длинной цепью (Han et al., 2012). У мяты (*Mentha spicata* Crantz) обнаружена обратная зависимость между уровнем экспрессии *MsYABBY5* и уровнем терпенов. Эктопическая экспрессия *MsYABBY5* у *Ocimum basilicum* и *N.*

sylvestris приводит к снижению продукции вторичных метаболитов, что говорит о роли MsYABBY5 как негативного регулятора вторичного метаболизма (Wang et al., 2016a).

1.6. Селекция растений и современные методы генной инженерии

В настоящее время существует множество биотехнологических методов, активно применяемых в селекции растений. Интеграция научных знаний обеспечивает решение таких задач, как ускорение процесса селекции и повышение эффективности отбора генотипов, являющихся донорами хозяйственно-ценных признаков. Результат данных исследований – ежегодно выращиваемые миллионы гектаров различных сортов и гибридов.

Направления биотехнологии растений подразделяются на методы культивирования клеток и тканей (культуры *in vitro*, которые могут использоваться на отдельных этапах селекции) и методы генной инженерии (мутагенез, получение трансгенных растений). Основным методом получения трансгенных растений является агробактериальная трансформация, основанная на заражении пораненных клеток растения штаммом *Agrobacterium tumefaciens* (или *A. rhizogenes*) и последующем встраивании тДНК из Ti (или Ri) плазмиды в ядерный геном растения. Для переноса нужного гена в геном растений, кассету экспрессии целевого гена клонируют в область тДНК вместе с кассетой экспрессии селективного гена (для отбора трансгенных регенерантов).

Большую популярность в последние годы набирает направленное редактирование генома растений с помощью технологии CRISPR/Cas. Данный метод уже продемонстрировал успешные результаты в получении сортов с повышенной урожайностью и устойчивостью к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Li et al., 2022). Метод основан на использовании бактериальной адаптивной иммунной системы, в которую входит белок группы CRISPR-associated (Cas) и кластер разделенных спейсерами палиндромных повторов Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR), узнающий чужеродную вирусную последовательность (Wang et al., 2016b). Наиболее хорошо изучена система CRISPR/Cas9, где эндонуклеаза Cas9 направляется гидовой РНК (guide RNA; gRNA) и вносит сайт-специфичные двухцепочечные разрывы в целевую последовательность ДНК (Matres et al., 2021).

Система CRISPR/Cas9 успешно применяется на различных зерновых культурах, таких как пшеница (Elsharawy and Refat, 2023), а также овощных культурах, например, сем Solanaceae (Das Dangol et al., 2019; Chandrasekaran et al., 2021).

Сем Solanaceae (Пасленовые) объединяет более 3000 видов, включая виды, прошедшие доместикацию с последующей селекцией. Это пищевые (картофель, томат, баклажан, перец, физалис), декоративные (петуния, дурман) и фармацевтические (табак, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*) культуры. Некоторые из них стали модельными объектами в генетических

исследованиях. Например, культурный томат и его дикорастущие родственники (род *Solanum*, секция *Lycopersicon*), табак (род *Nicotiana*) и петуния (род *Petunia*). Картофель используется в качестве модели корнеплодной культуры в исследованиях развития и хранения клубней и ответа на различные стрессовые факторы (Gebhardt, 2016), а также как модель для оптимизации технологии CRISPR/Cas-редактирования генома клубневых и полиплоидных культур (Carlsen et al., 2022; Perroud et al. 2022). Система CRISPR/Cas активно применяется для создания стрессоустойчивых, высокоурожайных сортов картофеля с повышенным качеством клубней. К примеру, получены линии с измененным соотношением амилопектина и амилозы в запасаемом крахмале (редактирован ген *Granule-bound starch synthase (GBSS)*), а также линии, устойчивые к засухе (*StCDF1*, *StFLORE*), ферментативному потемнению мякоти клубней (*StPPO2*) или фитофторозу (*StDND1*, *StCHL1*, *StDMR6-1*) (Chincinska et al., 2023).

Томат не менее популярен для редактирования, чем картофель. Результатом экспериментов по редактированию генома томата стала функциональная характеристика генов стрессоустойчивости: к засухе (*SIARF4*, *SIMAPK3*, *SILOX*, *SIGST*, *SIDREB*, *SIMAPK6*, *SINPR1* и *SILBD40*), избытку соли (*SILBD40*, *Slsos1-1*, *Slsos1-2*, *SIHyPRP1*, *HyPRP1*), холоду (*SICBF1*), повышенной температуре (*BZRI*) и облучению УФ-В (*SIUVR8*) (Chandrasekaran et al., 2021). Определены гены устойчивости томата к биотическим стрессорам: при инфекции *Pseudomonas* spp. (*SIJAZ2*, *SIDMR6-1*), *Phytophthora* (*SIDMR6-1*), *Fusarium oxysporum* (*Solyc08g075770*), *Botrytis cinerea* (*MAPK3*, *SIMYC2*) и *Oidium* spp. (*SIMlo1-SIMlo16*, *S-gene PMR4*, *SIPelo*) (Chandrasekaran et al., 2021).

Отметим, что у томата проведено редактирование некоторых генов *MADS-box* и *YABBY*. Показано, что CRISPR-нокаут *MADS-box* гена *RIN* приводит к увеличению срока хранения плодов (Ito et al., 2017; Li et al., 2020), а *MADS-box* гена *SIAGL6* – к индукции партенокарпии с сохранением жизнеспособности пыльцы (Klap et al., 2017). Нокаут гена *YABBY2b* вызывает уменьшение размеров растения (высота, цветки, плоды), что повышает их компактность и привлекательность для выращивания в условиях плотной посадки (Sun et al., 2020).

Таким образом, подходы и методы классической селекции растений постоянно совершенствуются в результате интенсивного развития методов сравнительного изучения геномов, транскриптомов, протеомов, метаболомов и тому подобного, а также способов модификации генов, от регуляции профиля экспрессии до изменения последовательности и функции кодируемого белка. Многие исследования носят практический характер (получение генотипов с улучшенными хозяйственно-ценными признаками), и в качестве мишени отбора используются гены регуляторов транскрипции, включая ТФ семейств *MADS* и *YABBY*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растения, штаммы, вектора

2.1.1. Растения

В работе были использованы растения:

- Табак *Nicotiana tabacum* L. сорт Samsun. Растения были введены в культуру *in vitro*. Для этого была проведена стерилизация семян путем выдерживания в 70% этаноле (1 мин) и 1% хлорсодержащем чистящем средстве (напр., доместос; 5 мин). Затем семена промывали стерильной дистиллированной водой (5 раз по 1–3 мин) и проращивали на среде А2 (табл. 1 в Приложении) с агаром в климатической камере в режиме длинного фотопериода (16 ч) и температуре 21°C. Культуру *in vitro* использовали для агробактериальной трансформации. При необходимости выращивания растений табака в тепличных условиях проводили адаптацию стерильных укоренившихся побегов, высаживая их в увлажненную почву и накрывая прозрачным покрытием. Покрытие удаляли на 5-й день после высадки растений.

- Картофель *Solanum tuberosum* L. Были использованы четыре раннеспелых сорта: Мишка, Жуковский ранний, Люкс и Терра (НИИ картофеля им. Лорха (Красково, Россия)), клубни которых различались по содержанию крахмала (14,2–17,7%, 10–12%, 11–15,0 % и 15,5–16,5%, соответственно). Все сорта характеризовались морозостойкостью и средней восприимчивостью к холодовому осахариванию клубней. Растения поддерживали *in vitro* путем черенкования и культивирования верхушечной части 3–4-недельных побегов на среде А2 (табл. 1 в Приложении) с агаром в климатической камере в режиме длинного фотопериода (16 ч) и температуре 21°C. При необходимости выращивания растений в тепличных условиях проводили адаптацию стерильных укоренившихся побегов аналогично табаку.

- Подбельник *Monotropa hypopitys* (синоним *Hypopitys monotropa*) — представитель цветковых семенных растений семейства Ericaceae. Это нефотосинтезирующий, бесхлорофилльный микогетеротроф, который получает углерод из корней автотрофных деревьев посредством монотропоидного микоризного симбиоза (Shchennikova et al., 2018). В процессе развития на корнях растения образуются почки – будущие побеги, представляющие собой цветонос с соцветием, которые выглядят как стебель с листьями и соцветием (Shchennikova et al., 2018). В работе были использованы растения подбельника европейской части России (хвойный лес в Калужской области; собраны в августе) типа В (100% гомология генома с экземплярами из Японии, Финляндии, Великобритании и Швеции (Shchennikova et al., 2018)). Отдельное растение представляло собой микоризную корневую систему с адвентивными почками, дающими начало цветоносу (~15 см) с прицветниками (выглядят как листья) и

соцветием (~10 цветков). Растения были выкопаны и вместе с лесным грунтом перенесены в тепличные условия (день/ночь: +21°C/23°C, 16ч/8ч) с искусственным затемнением.

- Томат *Solanum lycopersicum* L. Данный вид (сорт Silvestre recordo) был использован для клонирования кодирующей последовательности целевого *MADS-box* гена. Для этого растение выращивали в теплице при длинном фотопериоде (16 ч), температурном режиме ‘день/ночь: +21°C/23°C’ и высокой освещенности (300-400 мкмоль м⁻² с⁻¹).

2.1.2. Штаммы

Штамм *Escherichia coli* XL1-blue (<https://evrogen.ru/products/cloning/competent-cells/>); условия выращивания – среда LB (тетрацилин 12,5 мг/л, табл. 1 в Приложении), 37°C.

Штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0; условия выращивания – среда LB (рифампицин 12–25 мг/л), 28°C, 140-200 rpm.

Дрожжевой штамм *Saccharomyces cerevisiae* Pj69-4a; условия выращивания – среда SD с аминокислотами (табл. 1 в Приложении), 30°C, 140-200 rpm.

2.1.3. Вектора

В работе были использованы вектора для анализа белок-белковых взаимодействий в GAL4-дрожжевой системе (рис. 7, 8), агробактериальной трансформации растений (рис. 9) и CRISPR-Cas9-редактирования генома растений (рис. 10, 11).

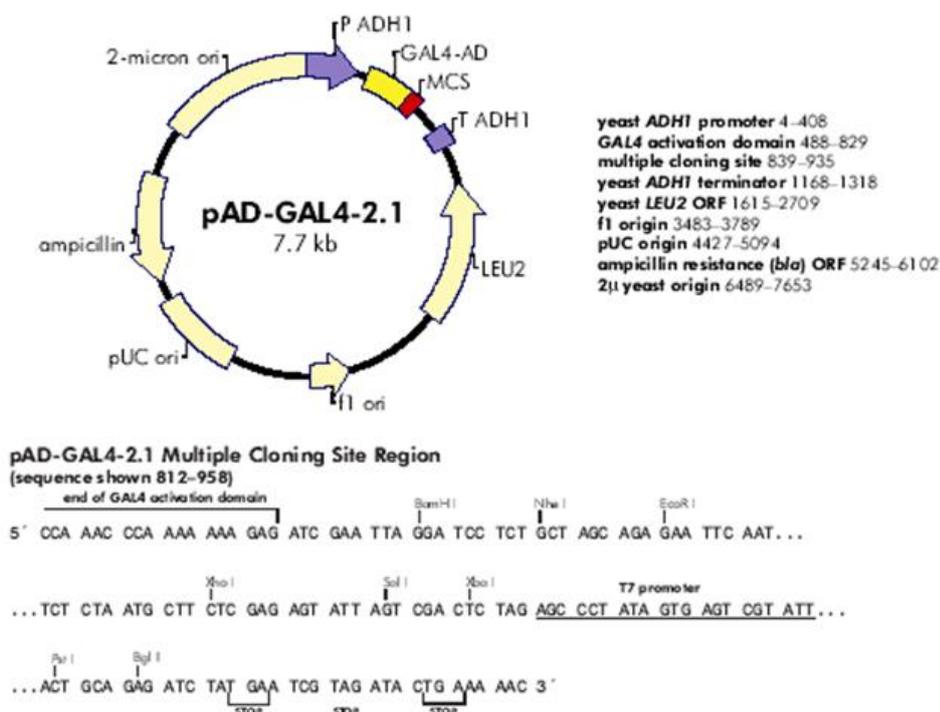
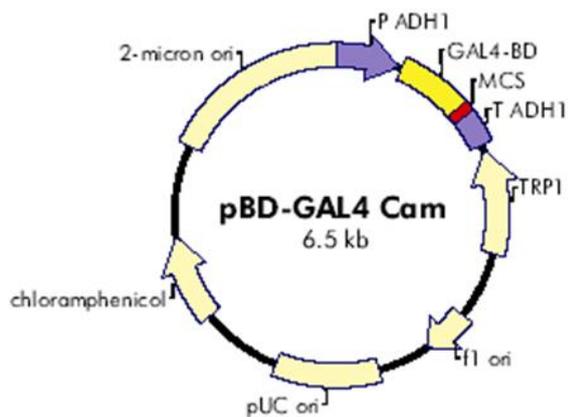


Рисунок 7 – Схема вектора pAD-GAL4 (<https://www.addgene.org/vector-database/5853/>)

yeast ADH1 promoter 4-408
 GAL4 DNA binding domain 434-877
 multiple cloning site 878-941
 yeast ADH1 terminator 948-1154
 yeast TRP1 ORF 1197-1871
 f1 origin 2322-2628
 pUC origin 2970-3637
 chloramphenicol resistance ORF 4174-4725
 2μ yeast origin 5330-6489



pBD-GAL4 Cam Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 854-991)

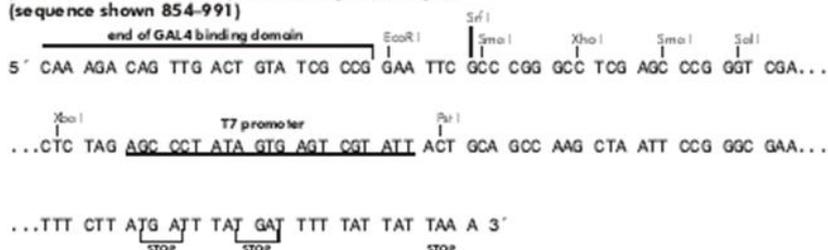


Рисунок 8 – Схема вектора pBD-GAL4 Cam (<https://www.addgene.org/67911/>)

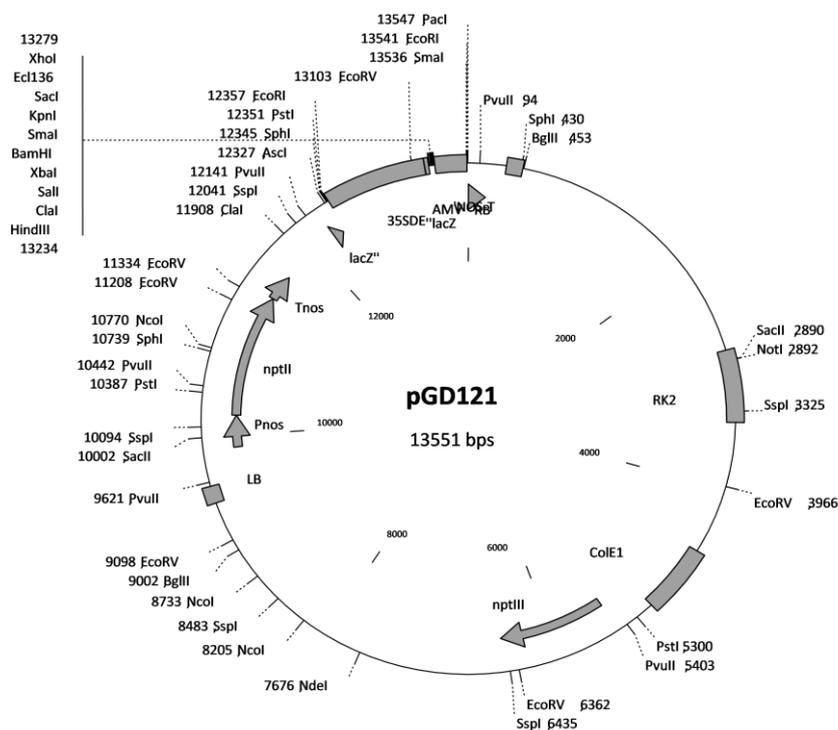


Рисунок 9 – Схема бинарного вектора pGD121

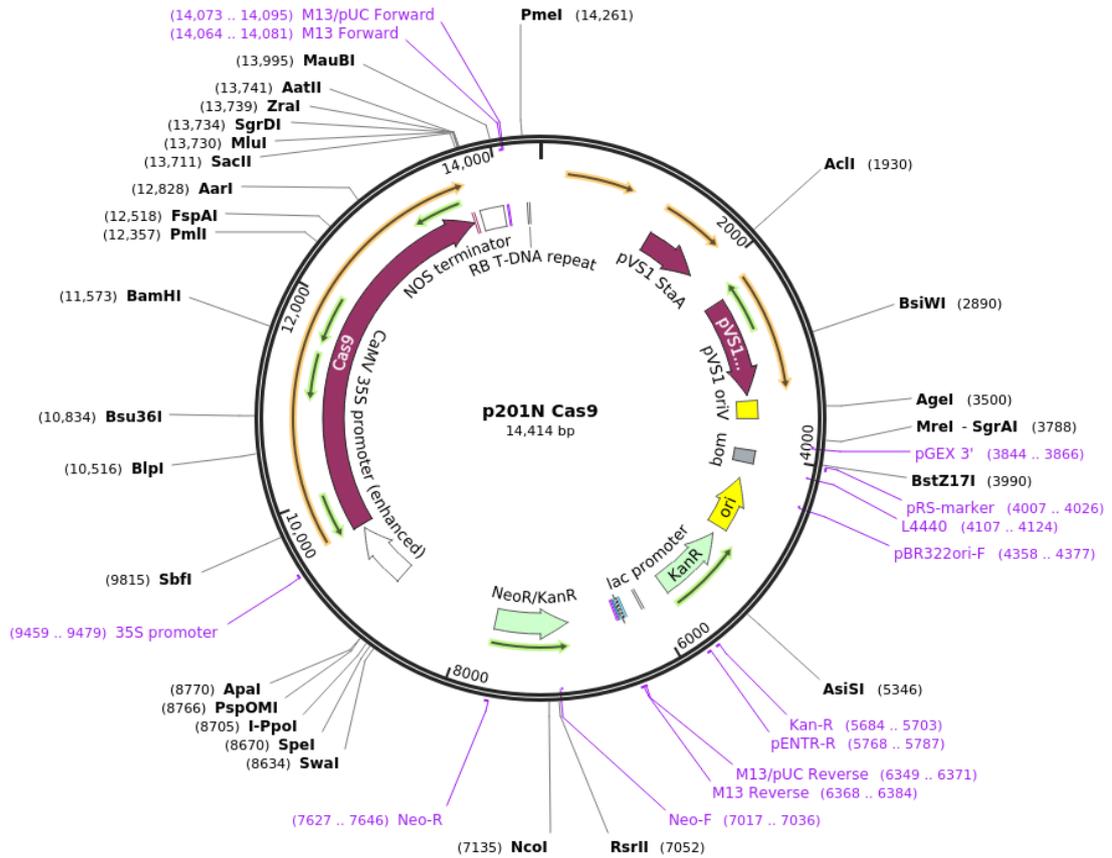


Рисунок 10 – Схема плазмиды p201N_Cas9 (AddGene, США; кат. № 59175; <https://www.addgene.org/>)

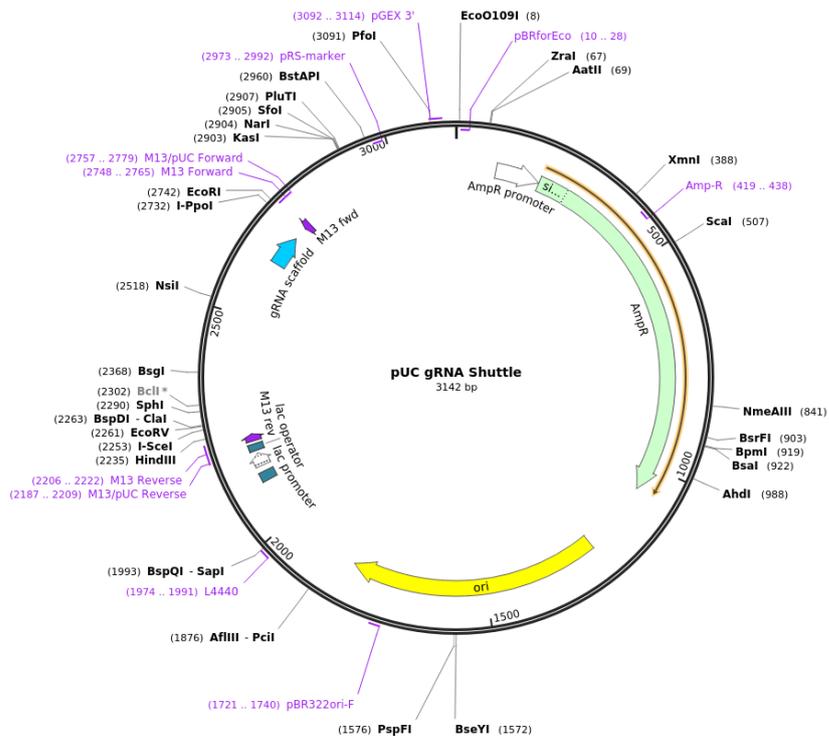


Рисунок 11 – Схема плазмиды pUC_gRNA_Shuttle (AddGene, США; кат. № 47024)

2.2 Растворы и среды

В работе были использованы питательные среды для выращивания бактериальных и дрожжевых штаммов (LB и SD, соответственно), а также для культуры *in vitro* и трансформации растений (среды на основе солей MS) (табл. 1 в Приложении).

Для проведения электрофореза ДНК использовали буфер TBE (5,5 г/л H_3BO_3 , 11 г/л Tris-HCl, 0,75 г/л EDTA, pH 5.5) и 1-2% агарозный гель.

Для приготовления бактериальных компетентных клеток готовили растворы Mg^{2+} (0,5M MgSO_4 , 0,5M MgCl_2), и Ca^{2+} (10мM Tris-HCl pH7.5, 50мM CaCl_2).

Для выделения геномной ДНК растений использовали буфер SHORTLY (0,2M Tris-HCl pH 9.0; 0,4M LiCl; 25мM EDTA; 1% SDS).

Стоковые 10 X растворы аминокислот готовили с использованием 16 L-аминокислот в следующих концентрациях (мг/л): 200 (Adenine, Arginine, Histidine, Methionine, Tryptophan, Uracil), 300 (Isoleucine, Lysine, Tyrosine), 500 (Phenylalanine), 1000 (Leucine, Glutamic acid, Aspartic acid), 1500 (Valine), 2000 (Threonine) и 4000 (Serine). Для приготовления селективных растворов убирали из состава раствора конкретные аминокислоты (например, Tryptophan в случае использования плазмиды pBD_GAL4_cam).

2.3. Компетентные клетки *E. coli*

1. Ночную культуру XL1-blue (100 мкл) разводили 10 мл среды LB, содержащей 100 мкл раствора Mg^{2+} , и выращивали (160-240 грм, 37°C) до оптической плотности OD=0,4-0,5 о. е.
2. Выдерживали культуру 20 мин при 0-4°C, затем центрифугировали (ц/ф) (3 мин, 3000 грм, +4°C), осадок суспендировали в 3 мл раствора Ca^{2+} , охлаждали 15-20 мин при 0-4°C и снова осаждали (ц/ф 3000 грм, 3 мин, +4°C).
3. Осадок суспендировали в 0,5 мл раствора Ca^{2+} с добавлением 10% глицерина, 100-мкл аликвоты замораживали в жидком азоте и хранили при -70-80°C.
4. Для трансформации клеток плазмидной ДНК размораживали на льду 50-200 мкл компетентных клеток, добавляли к ним 0,01-10,0 нг ДНК, инкубировали 20 мин при 0-4°C, затем осуществляли тепловой шок (1 мин при 42°C) и возвращали в лед на 2 мин.
5. Далее разводили клетки в 5 раз средой LB, инкубировали с покачиванием 1 ч при 37°C, высевали на агаризованную LB с селективным антибиотиком и оставляли на ночь при 37°C.

6. Выросшие, устойчивые к антибиотику колонии тестировали на присутствие плазмиды с помощью ПЦР-амплификации фрагмента, содержащегося в плазмиде, или выделения плазмиды с последующей рестрикцией/секвенированием.

2.4. Компетентные клетки агробактерии

1. Ночную культуру агробактерии, выращенную в течение 1-2 суток при 28°C в 5 мл LB с добавлением Rif (12,5 мг/л) и 1/100 V раствора Mg²⁺, разводили в 10 раз свежей средой LB (с той же концентрацией Mg²⁺, без антибиотиков) и выращивали (140 грм, 28°C) около 4 ч до OD=0,5-1,0 о.е.

2. Далее культуру охлаждали во льду (15-20 мин), ц/ф (3000 грм, 10 мин, 4°C), и осадок отмывали, суспендируя его в 10 мл предварительно охлажденного 150 мМ NaCl с последующим ц/ф (3000 грм, 10 мин, 4°C).

3. Затем отмытые от среды клетки суспендировали в 1 мл предварительно охлажденного 20 мМ CaCl₂. Аликвоты по 100-200 мкл различали по отдельным микропробиркам и либо сразу использовали для трансформации плазмидной ДНК (см. далее), либо добавляли 30% глицерин (1:1), быстро замораживали в жидком азоте и хранили на -80°C.

4. Для трансформации, к 100-200 мкл суспензии клеток добавляли 1 мкг плазмидной ДНК (в объеме не больше 5-10 мкл) и оставляли при 4°C на 30 мин. Для теплового шока сначала помещали пробирки в жидкий азот (1 мин) и затем сразу на 37°C (водяная баня, 5 мин). После этого разводили клетки в 5 раз средой LB, инкубировали 2 ч (28°C) с покачиванием (140 грм) и быстро ц/ф (3000 грм, 3 с). Осадок клеток суспендировали в стерильной воде и в нескольких разведениях высевали на чашки с агаризованной LB (Rif 12,5 мг/л, Km 50-100 мг/л). Выращивали при 28°C в течение 2-3 суток. Отдельные колонии валидировали с помощью ПЦР и использовали для трансформации растений.

2.5. Агробактериальная трансформация табака *N. tabacum*

1. Листья стерильных растений *in vitro* нарезали секторами (~0,3–0,5 см²), убирая жилки, и замачивали (внешней поверхностью вверх) на 40 мин (комнатная температура, темнота) в суспензии агробактериальных клеток, содержащих бинарный вектор с целевым трансгеном. Для приготовления суспензии, 10 мл ночной культуры агробактерии ц/ф (3000 грм 10 мин), и осадок суспендировали в 0,5 мл жидкой А2.

2. Экспланты подсушивали, помещали на агаризованную среду А2 верхней поверхностью листа вниз и оставляли в темноте при комнатной температуре на 48 ч.

3. Экспланты промывали в жидкой среде А2 (Сб 500 мг/л), подсушивали, выкладывали на агаризованную среду А3 (Км 100 мг/л, Сб 500 мг/л) и оставляли в условиях длинного фотопериода (16ч) и температуры 23°C. Раз в 14 дней перекладывали экспланты на свежую среду.

4. Регенеранты укореняли на той же среде (но без БАП) и переносили в теплицу, после чего адаптированные, подросшие растения анализировали (ПЦР) на присутствие в геноме трансгена. В конце жизненного цикла собирали семена Т₁ и проращивали на среде с канамицином (рис. 12). Устойчивые к антибиотику побеги использовали для анализа следующего поколения.



Стрелками указаны погибшие на селективной среде растения

Рисунок 12 – Растения поколения Т₁, полученные при проращивании семян регенерантов на среде MS (Км 100 мг/л)

2.6. Агробактериальная трансформация картофеля *S. tuberosum*

1. В качестве эксплантов для трансформации использовали междоузлия стеблей 3-недельных растений картофеля *in vitro*. Стеблевые сегменты выдерживали 24 ч в темноте при комнатной температуре на стерильной фильтровальной бумаге, покрывающей агаризованную среду А2.

2. Добавляли 0,5 мл суспензии агробактериальных клеток, полученной суспендированием в 0,5 мл среды А2 осадка клеток после ц/ф (5000 грм, 10 мин) 5 мл ночной культуры. Выдерживали 4 ч.

3. Экспланты подсушивали, оставляли на 24 ч на агаризованной среде СИМ, а затем выкладывали на среду СИМ с добавлением антибиотиков (Км 50 мг/л, Сб 250 мг/л), раз в 7 суток меняя среду на свежую.

4. Образование регенерантов наблюдали спустя 5-7 недель культивации. Побегов укореняли на агаризованной среде А2 (Km 50 мг/л, Сb 250 мг/л) и тестировали (ПЦР) на наличие в геноме трансгена.

5. Полученные трансгенные линии культивировали *in vitro* в климатической камере при длинном дне (16 ч) и 21°C.

2.7. Трансформация дрожжевого штамма

1. Штамм Pj69-4a сеяли штрихом на агаризованную SD с 16ю аминокислотами. Одну свежую колонию суспендировали в 1 мл стерильной H₂O, ц/ф (60 с, 6000 rpm), осадок снова суспендировали в 1 мл 0.1 М CH₃OOli и инкубировали при 30°C в течение 5 мин.

2. Далее клетки осаждали ц/ф (10 с., 10000 rpm), пипетировали в 65 мкл H₂O. К суспензии добавляли 36 мкл 1М CH₃OOli, 5 мкл денатурированной ДНК спермы сельди (10мг/мл), 0,2-0,3 мкг плазмиды, снова перемешивали пипетированием. Затем добавляли 240 мкл 50% ПЭГ-3350 и интенсивно встряхивали трансформационную смесь в течение 50-60 с.

3. Полученную суспензию подвергали тепловому шоку (42°C, 20 мин), охлаждали во льду (2 мин) и ц/ф (10 с, 10000 rpm).

4. Клеточный осадок, суспендированный в 0,2-0,4 мл стерильной H₂O, высевали на агаризованную среду SD (с селективным раствором аминокислот) и инкубировали при 28-30°C в течение 2-3 суток.

5. Полученные колонии тестировали (ПЦР) на наличие плазмиды и использовали в экспериментах по анализу белок-белковых взаимодействий (согласно Shchennikova et al., 2003).

2.8. Экстракция геномной ДНК

1. Измельчали 0,1-1,0 г ткани растения пестиком в фарфоровой ступке с использованием жидкого азота.

2. Порошок переносили в микропробирку, смешивали с 250 мкл буфера SHORTLY и ц/ф (10 мин, 10000 rpm).

3. Смешивали 1:1 (по 175 мкл) супернатант с изопропанолом, ц/ф (15 мин, 10000 rpm) и отбирали жидкость.

4. Осадок высушивали (перевернутая пробирка, 30 мин, комнатная температура) и растворяли в 100 мкл H₂O (30 мин), затем очищали от дебриса ц/ф (5 мин, 10000 rpm).

5. 95 мкл надосадочного раствора интенсивно встряхивали с 95 мкл насыщенного фенола, 5 мин на столе, ц/ф (10 мин, 14000 rpm), отбирали 90 мкл водной фазы и переосаждали EtOH ц/ф (10 мин, 14000 rpm).

6. Осадок геномной ДНК высушивали и растворяли в 50-100 мкл стерильной H₂O; хранили при +4°C.

2.9. Использование стандартных наборов для молекулярно-генетических и биохимических работ

1. Для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток применяли набор WizardPlus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США), согласно прилагаемому протоколу. Хранили препараты ДНК при –20°C.

2. Суммарную РНК экстрагировали из тщательно измельченной растительной ткани и очищали от примесей ДНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase-free DNase set; QIAGEN, Германия). Затем, РНК использовали для синтеза (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США).

3. Препараты РНК и кДНК тестировали на качество (электрофорез в агарозном геле) и количество (флуориметр Qubit, Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при –70-80°C.

4. Очистку ампликонов из реакционной ПЦР-смеси или агарозного геля выполняли с MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, США).

5. Фрагменты ДНК клонировали в вектор pGEM®-T Easy (Promega, США), согласно прилагаемому протоколу.

6. Общее содержание крахмала в образцах измеряли с помощью набора «Крахмал» (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Швейцария) согласно прилагаемому протоколу. Анализ проводили в трех технических и двух биологических повторях.

7. Содержание сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) определяли с помощью тестов Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия).

2.10. Использование метода ПЦР

Стандартную ПЦР-амплификацию на геномной ДНК растений или плазмидной ДНК выполняли в условиях (95°C, 4 мин; далее 25-42 цикла (94°C, 30 с; T_{отжига} праймера, 30 с; 72°C, 60с); 72°C, 7-10 мин) с использованием ПЦР-амплификатора Mastercycler (Eppendorf, Германия). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1-2% агарозном геле и, предварительно очистив/клонировав, секвенировали (ЦКП «Биоинженерия», ФИЦ Биотехнологии РАН).

Праймеры подбирали путем анализа целевых последовательностей, полученных в результате опыта или доступных в NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (табл. 2 в Приложении).

2.11. Определение экспрессии гена

Для анализа экспрессии гена использовали полуколичественную (с набором OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN, Германия) или количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). РВ-ПЦР проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) в двух биологических и трех технических повторах и с набором “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX” (Синтол, Россия). Используемая программа включала этап денатурации (5 мин, 95°C) и 40 повторений цикла (15 с, 95°C; 40 с, 60°C). Полученные данные нормализовали по экспрессии референсных генов (Graph Pad Prism, <https://www.graphpad.com>, США).

2.12. Фенотипический анализ растений

Фенотип опытных растений оценивали в сравнении с контролем дикого типа.

При оценке трансгенных растений табака *N. tabacum* определяли:

1. Период (дни) от высадки растения в теплицу до инициации цветения (период вегетации);
2. количественные характеристики надземной вегетативной части (длина стебля, количество листьев) и строение соцветия и цветка (включая морфологические изменения, число плодов и вес семян на одну коробочку) на стадии завершения жизненного цикла (сухих семенных коробочек);
3. визуальные особенности окраски листьев.

В случае редактированных (ген *RHO1a*) растений картофеля (сорта Мишка, Жуковский ранний, Люкс и Терра) оценивали:

1. характеристики вегетативной части регенерантов *in vitro* (высота и кустистость растений, масса проросткой без корня и масса корней, наличие воздушных корней) в условиях климатической камеры (16ч фотопериод, +21°C);
2. те же характеристики вегетативной части наиболее интересных линий регенерантов *in vitro*, выращиваемых в условиях холодового стресса (+4°C).

2.13. Имитация холодового стресса при выращивании модифицированных растений табака и картофеля

В случае картофеля, редактированные линии и контрольные растения выращивали *in vitro* в пластиковых контейнерах объемом 1 л, содержащих среду А2 (с Км 50 мг/л для редактированных линий), в стандартных условиях климатической камеры (16ч фотопериод,

+21°C) в течение 3 недель. Далее половину растений каждого типа оставляли расти в тех же условиях, а другую половину переносили на +4°C на 3 дня. Затем все растения анализировали на содержание крахмала в корнях и листьях и уровень экспрессии генов метаболизма крахмала и отдельных *MADS-box* генов.

В случае табака, трансгенные линии и контрольные растения выращивали *in vitro* в чашках Петри, содержащих среду А2 (с Км 50 мг/л для трансгенных линий), в стандартных условиях климатической камеры (16ч фотопериод, +21°C) до появления семядолей. Далее половину растений каждого типа оставляли расти в тех же условиях, а другую половину переносили на +10°C на 3-4 недели, после чего оценивали размеры проростков.

2.14. Анализ содержания каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов

Содержание пигментов определяли (два биологических и три технических повтора) в тканях листа, предварительно измельченных растиранием в жидком азоте.

Суммарное содержание антоцианов (мг/г сырого веса) измеряли в хлороформ-метанольных экстрактах с помощью Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия), согласно (Solovchenko et al., 2001), в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид,

Содержание (мг/г сырого веса) хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов (сумма каротинов и ксантофиллов) анализировали по протоколу (Efremov et al., 2020) с использованием Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

2.15. Статистический анализ данных

Данные фенотипических характеристик растений обрабатывали статистически с помощью Excel, и РВ-ПЦР и биохимического анализа – с помощью Graph Pad Prism (<https://www.graphpad.com>, США). Использовали Welch-test или one-way ANOVA ('multiple comparisons, corrected with Bonferroni test') в зависимости от количества сравнений ($P < 0.05$ означало наличие достоверных различий между образцами). Пакет программ Graph Pad Prism использовался также для поиска корреляций между экспрессией гена и содержанием метаболита.

2.16. Биоинформационный анализ

Профиль экспрессии генов анализировали, кроме РВ-ПЦР, *in silico* – с использованием биоинформационных методов и доступных баз транскриптомных данных. Так, уровень транскриптов генов *S. lycopersicum* в различных органах растения на разных стадиях развития определяли с помощью TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>).

Пакет программ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) использовали для поиска гомологичных последовательностей и структурного анализа генов и белков. Выравнивание гомологичных последовательностей, построение филогенетических дендрограмм, поиск полиморфизмов осуществляли с помощью пакета программ MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). В частности, для построения дендрограмм использовали метод максимального правдоподобия, основанного на JTT matrix-based модели, бутстрэп 1000. Поиск консенсусов в аминокислотных последовательностях проводили в программе MEME 5.5.4 ('motif discovery': <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). В процессе клонирования фрагментов ДНК в плазмидные вектора использовали программу Clone Manager (<https://ru.freedownloadmanager.org/Windows-PC/Clone-Manager.html>). Предсказание пространственной структуры белка проводили с помощью программе Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Структурно-функциональный анализ генов семейства YABBY клады FIL подбельника и хризантемы

3.1.1. Структура и филогения ТФ семейства YABBY

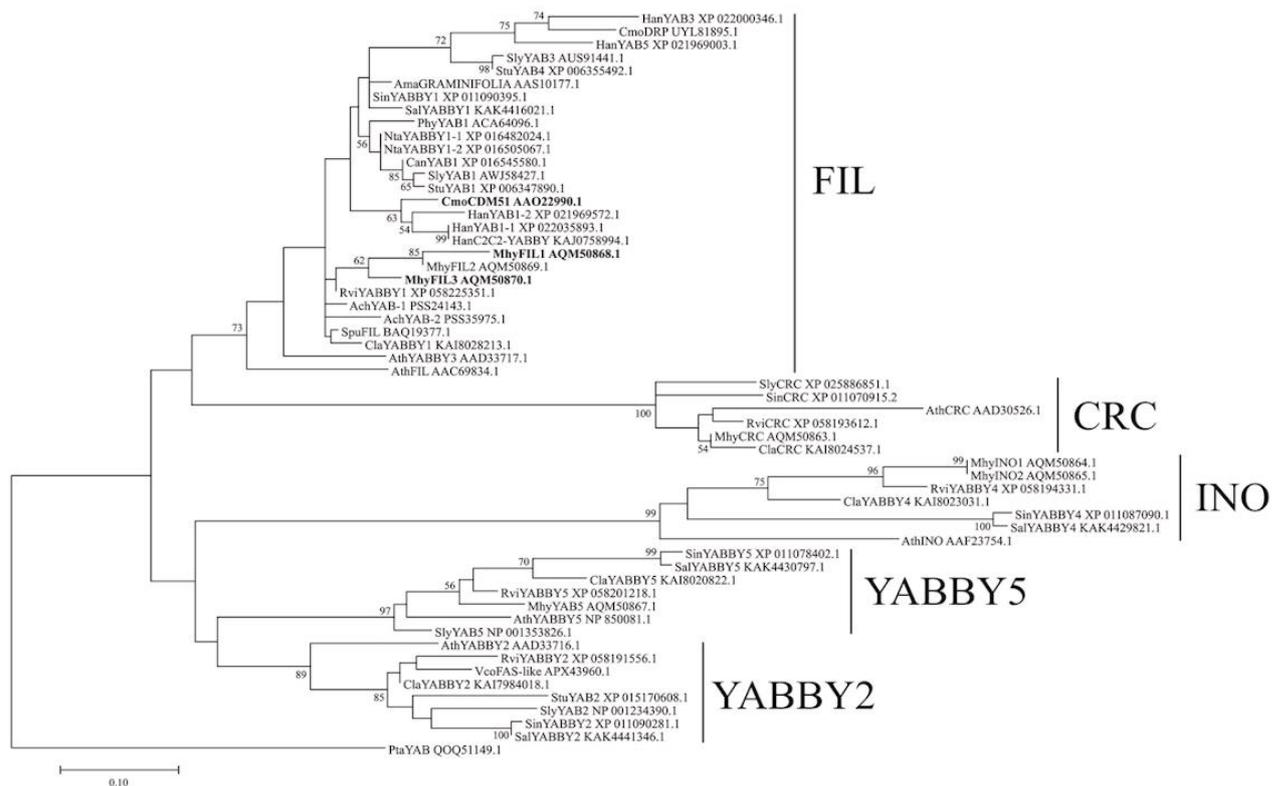
В данной части работы был проведен функциональный анализ генов, кодирующих ТФ YABBY подсемейства FIL у видов *M. hypopitys* (*MhyFIL1*, *MhyFIL3*, подбельник) и *C. x morifolium* (*CDM51*, хризантема). Гены семейства YABBY подбельника были идентифицированы ранее в процессе транскриптомного анализа (Beletsky et al., 2016; Shchennikova et al., 2018). Ген *CDM51* был также найден в нашей лаборатории ранее (неопубликовано, NCBI ID AAO22990.1).

Мы провели структурно-филогенетический анализ последовательностей ТФ YABBY подбельника и хризантемы в сравнении с гомологичными белками других видов растений.

Вид *M. hypopitys* входит в семейство Ericaceae, *C. x morifolium* – Asteraceae; оба семейства входят в кладу Asterids. Поиск последовательностей YABBY, доступных в базе данных NCBI, позволил отобрать для филогенетического анализа белки различных видов клады Asterids, включая семейства Ericaceae (информация ограничена видами *Rhododendron* spp. и *Vaccinium* spp.), Actinidiaceae (*Actinidia chinensis*) и Sarraceniaceae (*Sarracenia purpurea*), входящие в порядок Ericales. С учетом использования в работе табака *N. tabacum* в анализ были взяты ТФ YABBY различных видов Solanaceae (томат, картофель, перец, петуния, табак). Также в анализ были добавлены ТФ YABBY подсолнечника *H. annuus* (Asteraceae) и представителя клады Rosids – модельного вида *A. thaliana* (Brassicaceae). Для укоренения дерева был использован ТФ PtaYAB вида *Pinus taeda* (Gymnospermae).

В результате была построена дендрограмма, где анализируемые последовательности классифицированы по подсемействам FIL, YABBY2, YABBY5, CRC и INO (рис. 13), определенным при исследованиях *A. thaliana* (Bartholmes et al., 2012; Finet et al., 2016). ТФ *CDM51*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3* вошли в подсемейство FIL, которое объединило наибольшее количество анализируемых последовательностей. Ближайшими гомологами *MhyFIL* ожидаемо стали белки растений порядка Ericales, а *CDM51* – семейств Asteraceae и Solanaceae (рис. 13).

Последующий структурный анализ подтвердил присутствие консервативного YABBY-домена у *CDM51* (положение 18-184 ао), *MhyFIL1* (22-183 ао) и *MhyFIL3* (20-181 ао), содержащего C₂C₂ домен цинкового пальца на N-конце и HLH-домен (включающий сигнал ядерной локализации) на C-конце (рис. 14). Это соответствовало известной структуре белков семейства YABBY (Bowman, 2000).



В анализ взяты белки *A. thaliana* (FIL, YABBY3, YABBY2, YABBY5, INO, CRC); *M. hypopitys* (Mhy); *H. annuus* (Han); *C. x morifolium* (Cmo, CDM51); *S. lycopersicum* (Sly); *S. tuberosum* (Stu); *P. x hybrida* (Phy); *C. annuum* (Can); *N. tabacum* (Nta); *Rhododendron vialii* (Rvi); *Camellia lanceoleosa* (Cla); *Sesamum indicum* (Sin); *Sesamum alatum* (Sal); *Vaccinium corymbosum* (Vco); *A. chinensis* (Ach); *S. purpurea* (Spu); *A. majus* (Ama); *Pinus taeda* (Pta). Приведены значимые значения bootstrap (≥ 50 ; для 1000 повторов)

Рисунок 13 – Дендрограмма на основе ТФ семейства YABBY разных видов цветковых растений

Дополнительным подтверждением того, что анализируемые ТФ MhyFIL и CDM51 являются функциональными гомологами FIL, стало обнаружение в их последовательностях консенсусов (FIL-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -I и -H), могущих нести функциональную нагрузку (рис. 14). FIL-I и -H локализуются между C₂C₂ и HLH и могут оказывать влияние на фолдинг YABBY-домена (Shchennikova et al., 2018). FIL-I присутствует и у двудольных, и у однодольных, и поэтому, возможно, связан с функцией FIL-предшественника. Второй мотив, FIL-H специфичен для двудольных и, возможно, возник после разделения с однодольными.



Рисунок 14 – Домены и мотивы в последовательности MhyFIL1, MhyFIL3 и CDM51

Последующий поиск консервативных мотивов у белков, использованных для филогенетического анализа, обнаружил три общих для Покрытосеменных консенсуса, которые соответствуют доменам C₂C₂ ('2', '3') и HLH ('1'). Также выявлены междоменные мотивы ('9', '5', '10', '7', '4', '6'), специфичные для подсемейства FIL (рис. 15). Согласно полученным структурным данным, ТФ MhyFIL и CDM51 входят в подсемейство FIL и могут выполнять сходную с известными гомологами функцию.

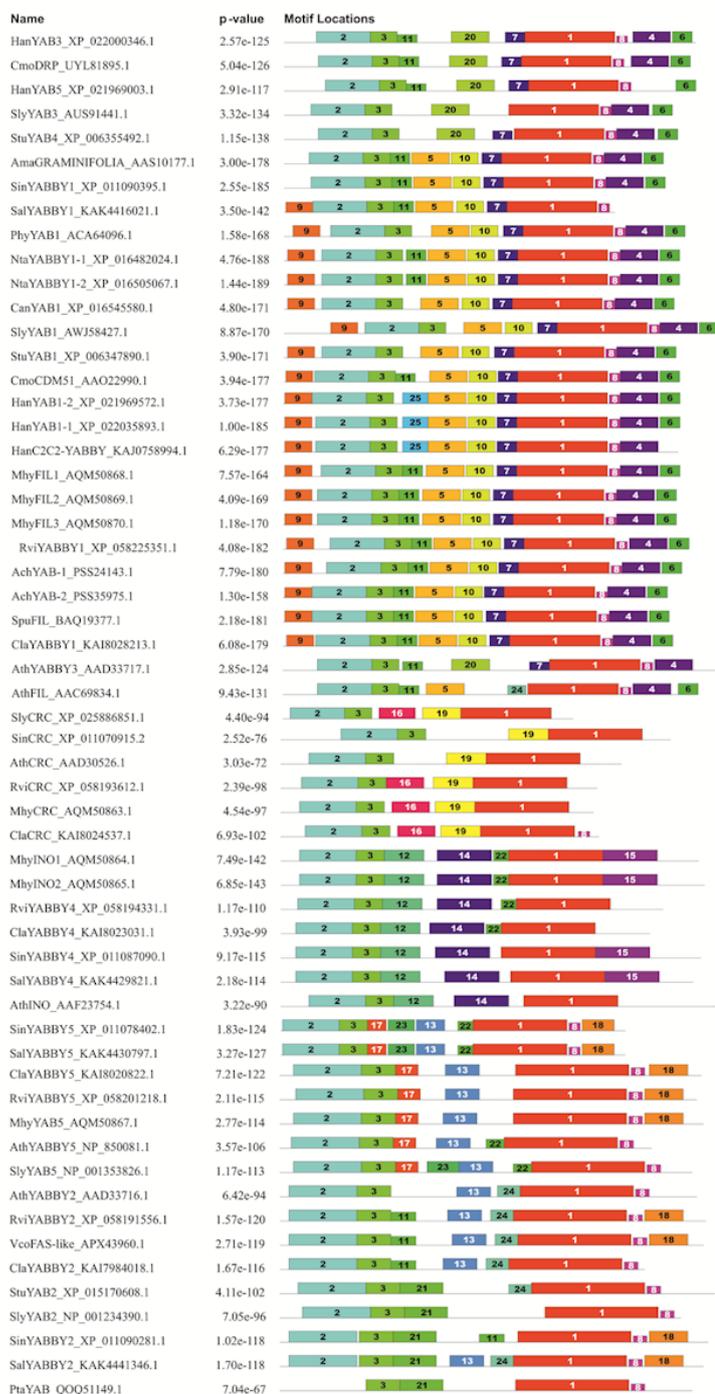


Рисунок 15 – Схема консервативных мотивов в последовательностях ТФ семейства YABBY *M. hypopitys* и других видов растений

3.1.2. Функция генов *MhyFIL1*, *MhyFIL3* и *CDM51*

Для оценки функции генов *CDM51*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3* были получены трансгенные растения табака со сверхэкспрессией кДНК генов (в смысловой (*s*) и антисмысловой (*as*) ориентации) под контролем промотора 35S CaMV и терминатора T-NOS (вектор pGD121, рис. 9). А именно, регенеранты T₀ 121::*FIL1s* (3 растения), 121::*FIL1as* (5), 121::*FIL3s* (12), 121::*FIL3as* (11), 121::*51s* (3) и 121::*51as* (18). Только в случае смысловой ориентации трансгена растения существенно отличались от контроля - сильно кустились и, если цвели, то очень поздно (табл. 3 в Приложении, рис. 16). Листья закручивались к нижней (абаксиальной) стороне, что предполагает нарушение идентичности клеток верхней (адаксиальной) поверхности листа. В пазушных меристемах листьев наблюдалось побегообразование. Корневая система трансформировалась в короткий утолщенный корень с отростками зеленой окраски (рис. 17). Из всего куста цвел только один побег и только в случае приобретения им фенотипа, сходного с контролем, что могло объясняться замалчиванием трансгена. Цветков формировалось значительно меньше, чем в норме (табл. 3-4 в Приложении, рис. 16), и визуально они не отличались от контроля, однако часто опадали из-за рано высыхающих цветоножек.

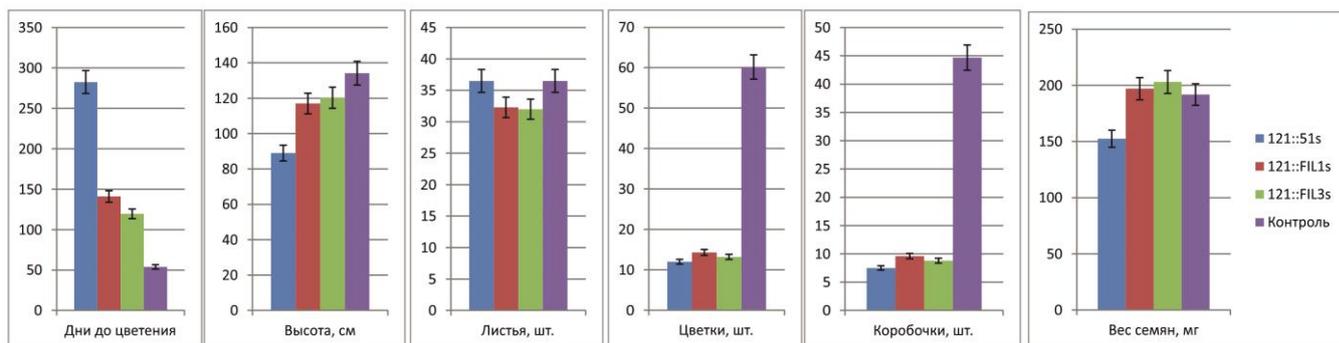


Рисунок 16 – Характеристики трансгенных растений табака vs контроль

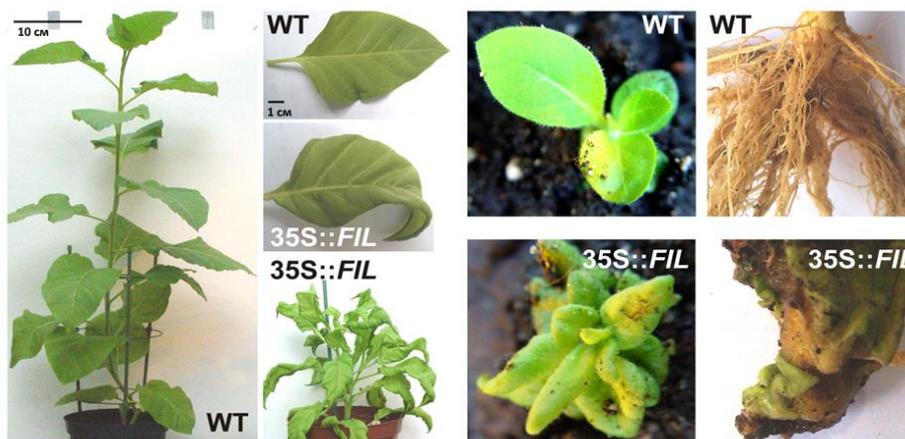


Рисунок 17 – Трансгенные растения 121::*51s*, 121::*FIL1s* и 121::*FIL3s* (35S::*FIL*) vs контроль (WT)

Растения со сверхэкспрессией генов в антисмысловой ориентации мало чем отличались от контроля. Так, у 121::51as существенно изменился только вес семян на одну семенную коробочку (в сторону уменьшения) (табл. 4-6 в Приложении, рис. 18). Отсутствие ожидаемого эффекта замалчивания *FIL*-гена *YABBY1-like* (XP_016505067.1) табака может объясняться низкой гомологией последовательности кДНК *YABBY1-like* и генов *FIL* хризантемы и подбельника (на белковом уровне идентичность составляет 78%, тогда как при сравнении кДНК перекрывается лишь 40% последовательности с идентичностью 81%).

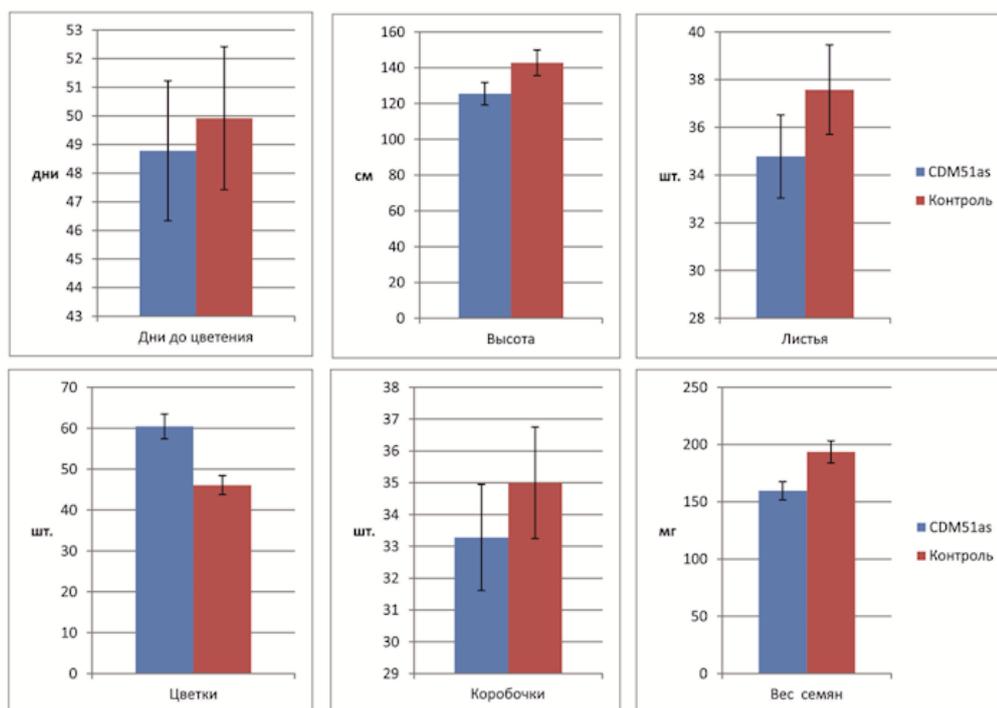


Рисунок 18 – Морфологические характеристики растений 121::51as vs контроль

Для подтверждения предположений об изменении идентичности верхней стороны листа у растений табака со сверхэкспрессией *FIL*-генов в смысловой ориентации был проведен микроскопический анализ поверхности листьев и на верхней стороне этих листьев обнаружены подобные устьицам образования (рис. 19). На основании этих данных мы предполагаем, что верхняя сторона листа приобрела признаки нижней поверхности, где в норме располагаются устьица, и это стало причиной скручивания листьев.

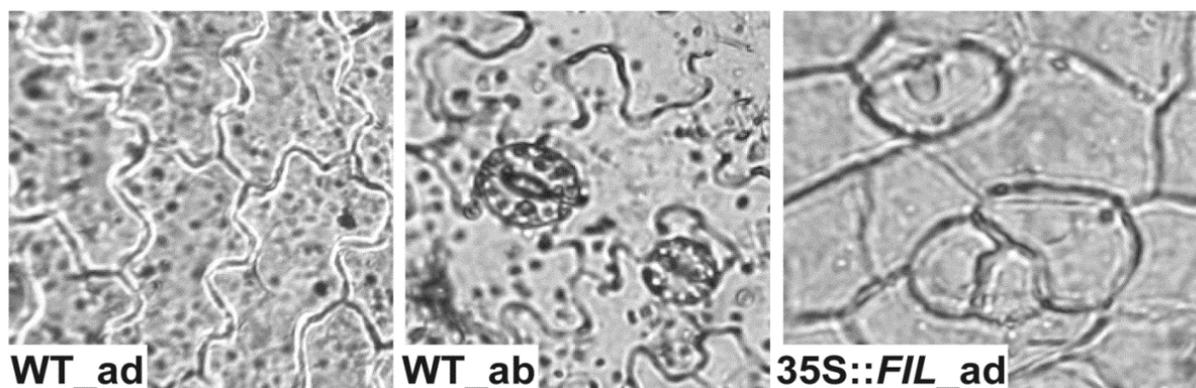


Рисунок 19 – Микроскопическая фотография верхней (ad) и нижней (ab) поверхности листа у контроля (WT) и трансгенных растений (35S::*FIL*)

В общей сложности девять регенерантов T₀ 121::*FIL1s* (6 растений), 121::*FIL3s* (2) и 121::*51s* (1) цвели и дали семена. Поколение T₁ характеризовалось усилением морфологических нарушений, что приводило к гибели растений. Исключением стало одно растение 121::*FIL3s*, которое крайне поздно цвело и дало семена T₂, которые прорастали и укоренялись, однако достигнув высоты ~1.5-3.0 см, останавливались в росте и погибали.

Таким образом, изменение идентичности клеток надземных органов под влиянием сверхэкспрессии генов подсемейства *FIL* оказалось критичным для развития и выживания растений. Эффекты от действия генов поддельника и хризантемы были схожими, что говорит о консервативности функции данных генов, несмотря на то, что поддельник не фотосинтезирует и не формирует листьев (Bidartondo, 2005; Buchanan-Wollaston et al., 2005; Shulga et al., 2018).

На примере *A. thaliana* показано, что нокаут генов *FIL* приводит к скручиванию листьев из-за адаксиализации клеток обеих поверхностей листа (Stahle et al., 2009). Это объясняют стремлением к приобретению радиальной симметрии, поскольку лист считается эволюционировавшим из радиально-симметричных стеблевых структур в результате приобретения абаксиально-адаксиальной асимметрии (Stahle et al., 2009). Мы использовали сверхэкспрессию генов *FIL*, что привело к абаксиализации клеток обеих поверхностей листа и его скручиванию, и согласуется с показанным ранее эффектом от сверхэкспрессии генов *FIL* пшеницы *T. aestivum* и репы *B. rapa* в растениях *A. thaliana* (Zhang et al., 2013). Сходные эффекты при сверхэкспрессии гомологичных генов *FIL* из отдаленных видов цветковых растений, независимо от их способности к фотосинтезу и формированию фотосинтезирующих органов, свидетельствуют о высокой консервативности функций *FIL*-генов в целом.

От активности *FIL*-генов зависит также корректное развитие АМП (Bartholmes et al., 2012). При сверхэкспрессии *FIL*-генов развитие АМП останавливается (Goldshmidt et al., 2008; Tononi et al., 2010), с чем согласуются и результаты нашего исследования.

Особенно интересны наблюдения, касающиеся радикальных модификаций корневой системы у взрослых растений 121::*FIL1s*, 121::*FIL3s* и 121::*51s*. Подобные данные отсутствуют в доступной литературе. В растении домен экспрессии генов семейства *YABBY* ограничен надземной частью, и мутации *yabby* не меняют характеристики корня (Boter et al., 2015). Развитие АМП и АМК поддерживается с помощью сходных регуляторных механизмов (Stahl et al., 2009; Chu et al., 2013). Наблюдаемые в нашей работе отклонения в развитии корня могут быть результатом экспрессии анализируемых трансгенов в несвойственной им области – АМК.

Таким образом, результаты нашего исследования подтвердили структурную и функциональную принадлежность генов *CDM51*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3* к подсемейству *FIL* (Щенникова и др., 2019).

3.2. Сверхэкспрессия *MADS-box* генов в растениях табака *N. tabacum* изменяет идентичность репродуктивных органов и время инициации цветения

Во второй части проведенной нами работы были исследованы структурно-функциональные особенности генов ТФ семейства *MADS-box* подгруппы МІКС^С различных видов Asterids. Данная подгруппа состоит из отдельных подсемейств и характеризуется наибольшим регуляторным воздействием на развитие растения. При этом их функции консервативны между видами цветковых растений (Smaczniak et al., 2012).

Ранее в нашей лаборатории были идентифицированы и структурно охарактеризованы семейства генов *MADS-box* хризантемы *C. x morifolium*, подсолнечника *H. annuus* и подбельника *M. hypopitys* (Щенникова и др. 2003; Шульга и др. 2008; Shulga et al. 2018).

Объектом наших исследований стали гены *MADS-box* трех видов Asterids: *C. x morifolium* (*CDM37* AAO22984.1, *CDM86* AAO22986.1, *CDM115* AAO22985.1, *CDM44* AAO22982.1), *H. annuus* (*HAM45* AAO18228.1, *HAM59* AAO18229.1) и томата *S. lycopersicum* (*SlMADS5* AAP57413.1). Данные гены частично были охарактеризованы ранее, и здесь мы продолжили анализ их функции.

3.2.1. Филогенетический анализ *MADS-box* генов

Целевые гены *MADS-box* были классифицированы с помощью сравнительного структурно-филогенетического анализа с использованием белковых последовательностей *MADS-ТФ* МІКС^С-типа анализируемых видов растений. На полученной дендрограмме *MADS-ТФ* разделились на 9 подсемейств. Исследуемые нами белки *CDM37*, *HAM45* и *HAM59* вошли в подсемейство AG (С-активность), *CDM86* и *CDM115* – PI и AP3, соответственно (B), и *CDM44* и *SlMADS5* – SEP (E) (рис. 20). Далее подсемейства AP3/PI, AG/SHP/STK и SEP1–4 были охарактеризованы более детально (рис. 21А-С).

В соответствии с тем, что семейства Asteraceae и Solanaceae входят в кладу Asterids, белки CDM37, HAM45, HAM59, CDM86, CDM44, CDM115 и SIMADS5 оказались наиболее близки своим ортологам у видов Asteraceae и Solanaceae; наименьшее сходство наблюдалось с ортологами из *A. thaliana* (клада Rosids) (рис. 20, 21). В случае белков С-активности было показано, что CDM37 хризантемы и HAM45 подсолнечника являются ближайшими ортологами и входят в один кластер с GAGA1 герберы, HAM59 входит в сестринский кластер с GAGA2, и все вместе – в кластер, определяемый AG (*A. thaliana*) и FARINELLI (FAR) (*A. maius*) (рис. 21B).

Анализ доменной структуры ТФ CDM37, HAM45, HAM59, CDM86, CDM44, CDM115 и SIMADS5 показал присутствие трех консервативных последовательностей – MADS, I, K, и варибельной С-концевой области. Это подтверждает, что данные белки относятся к типу II; структура и размер MADS-домена соответствует подгруппе MIKC^c.

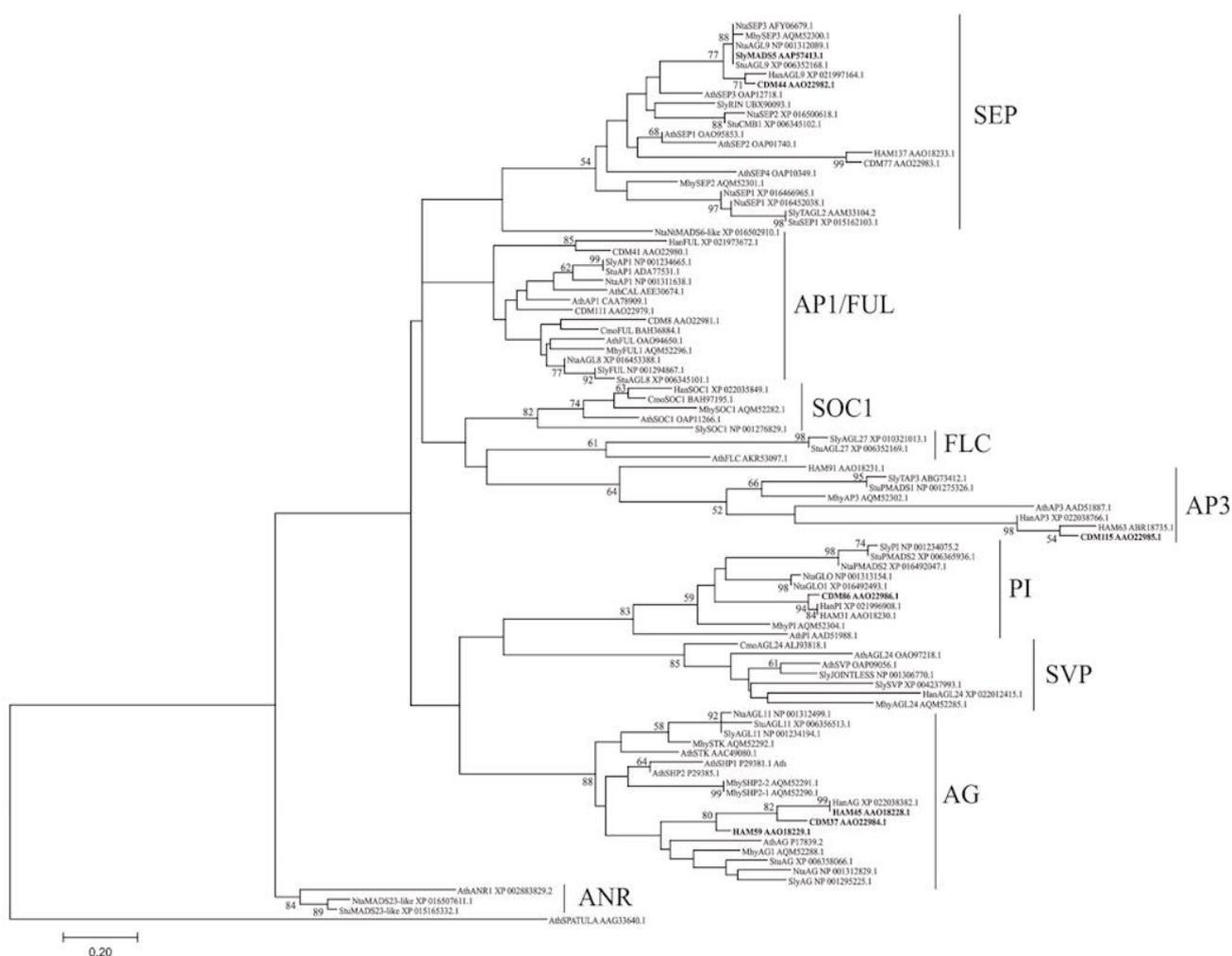


Рисунок 20 – Филогения MADS–ТФ видов *H. annuus* (Han, HAM); *C. x morifolium* (Cmo, CDM); *S. lycopersicum* (Sly); *M. hypopitys* (Mhy); *S. tuberosum* (Stu); *N. tabacum* (Nta); *A. thaliana* (Ath)

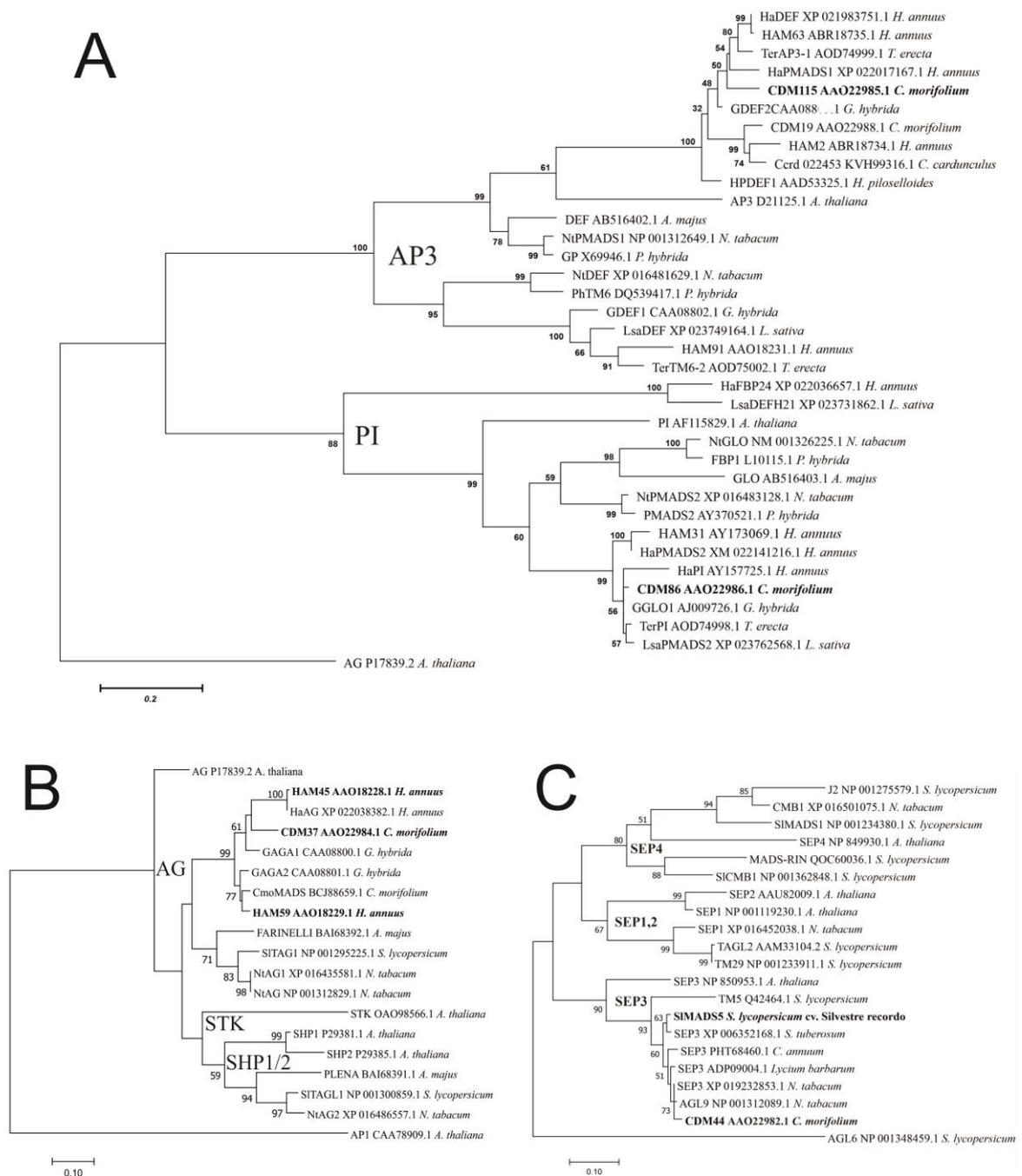


Рисунок 21 – Филогения MADS-доменных ТФ подсемейств AP3/PI (A), AG/SHP/STK (B) и SEP1–4 (C)

Проведенный далее поиск консервативных мотивов в тех же белках показал, что ряд последовательно расположенных консенсусов (1-2-3-5 для С-белков, 7-1-3-8-2-4 для Е-белков, 6-1-2(13)-3 для В-белков) соответствуют доменам MADS, I и К (рис. 22–24). Оставшиеся мотивы распределяются специфичным образом. К примеру, среди С-белков участки ‘7’ и ‘8’ отсутствуют у SHP1 и SHP2, а ‘6’, ‘8’ и ‘4’ у STK. Белки кластера GAGA1 имеют дополнительный N-концевой мотив ‘9’. От кластера PLENA (PLE) белки кластера FAR отличаются отсутствием С-концевого мотива ‘10’ (рис. 22). В последовательности белков Е-активности найдено пять специфичных участков. К примеру, подгруппа кластера SEP3,

объединившая белки Solanaceae (включая SIMADS5), содержала специфичный мотив ‘9’, тогда как подгруппа SEP3 Asteraceae (включая CDM44) – мотив ‘10’ в той же позиции (рис. 23). Для AP3-белков В-активности специфичными оказались С-концевые мотивы ‘4’, ‘8’ и ‘9’, а для PI-белков – консенсус ‘7’ (рис. 24).



Рисунок 22 – Схема консервативных мотивов у MADS-доменных ТФ С-активности

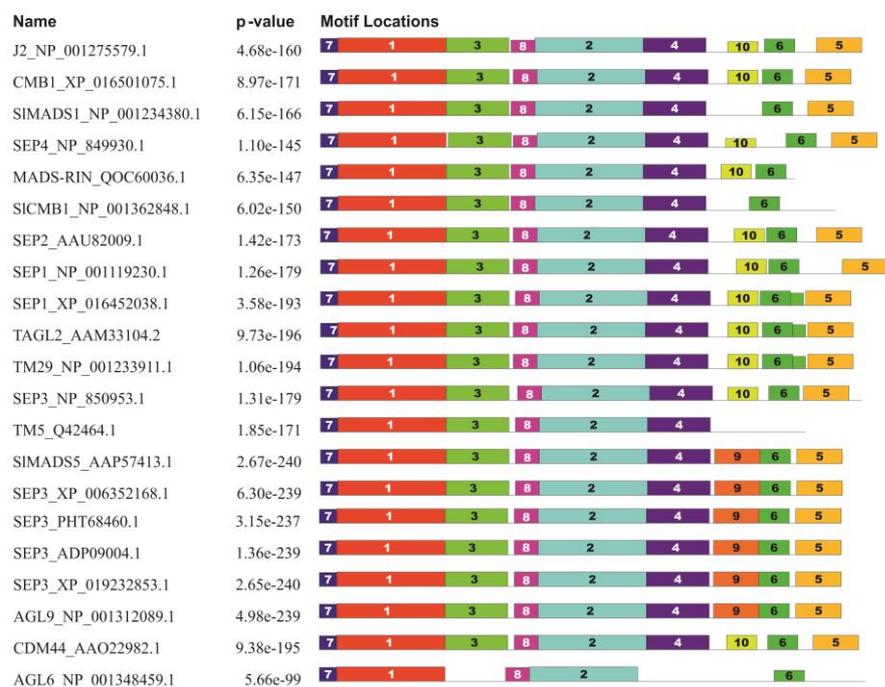


Рисунок 23 – Схема консервативных мотивов у MADS-доменных ТФ E-активности

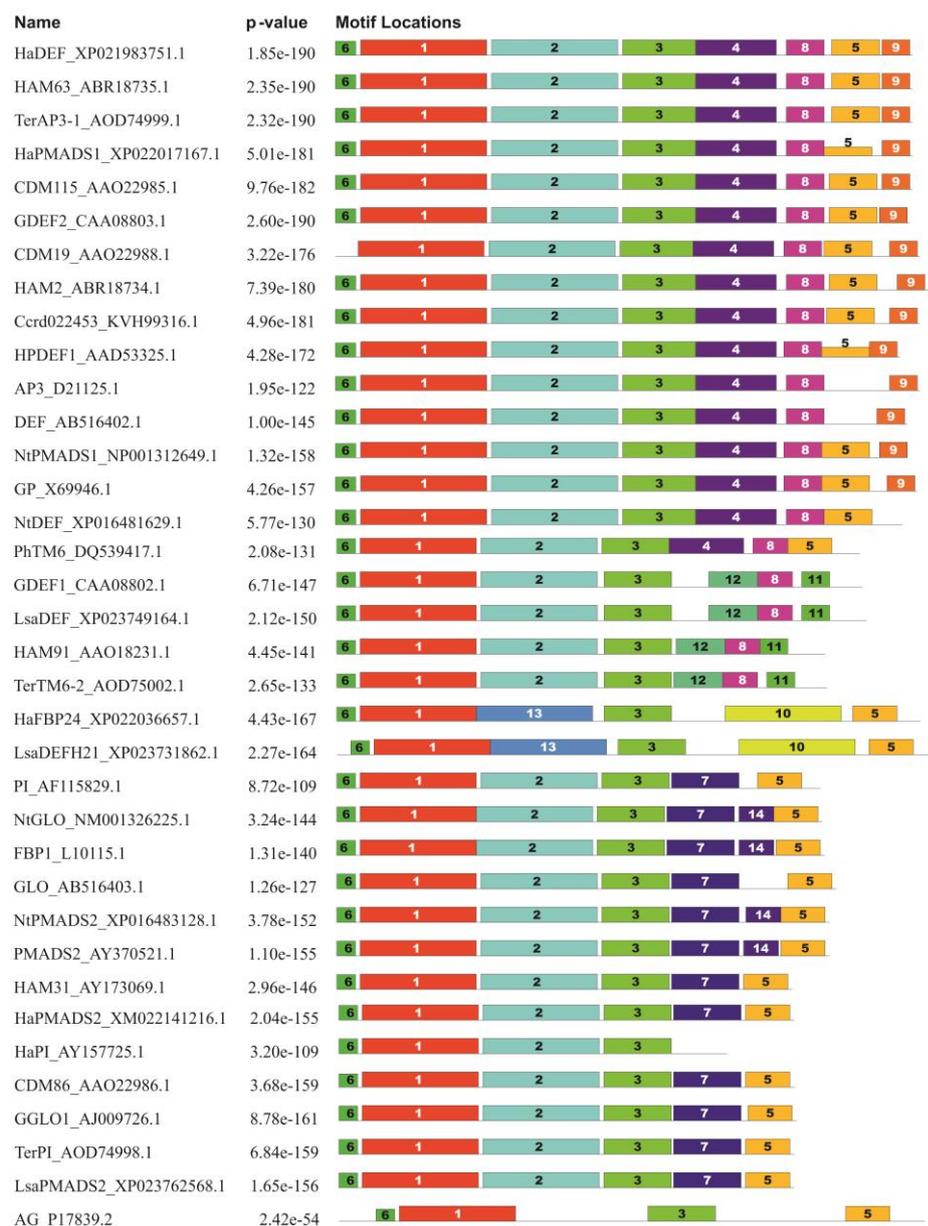


Рисунок 24 – Схема консервативных мотивов у MADS-доменных ТФ В-активности

Проведенный структурный анализ позволил классифицировать исследуемые нами белки и сделать предварительные выводы об их функции. В рамках ABC(E)-модели, CDM44 и SIMADS5 могут выполнять E-функцию (дифференцировка всех органов цветка, кроме чашелистиков). Белки CDM37, HAM45 и HAM59 (C-функция) могут контролировать закладку тычинок и пестика, а также терминацию развития цветка; CDM86 и CDM115 (B-функция) – лепестков и тычинок. Присутствие специфичных консенсусов в варибельной C-концевой области белков может быть ассоциировано с особенностями функции.

3.2.2. Получение трансгенных растений табака с эктопической конститутивной экспрессией гетерологичных *MADS-box* генов

Согласно проведенному филогенетическому анализу изучаемые *MADS*-доменные ТФ хризантемы, подсолнечника и томата эволюционно близки ортологам у табака. Таким образом, выбор модельного растения *N. tabacum*, а не *A. thaliana*, виделся нам более правильным, поскольку анализируемые ТФ при гетерологичной эктопической экспрессии с большей степенью вероятности могут продемонстрировать свою функцию в растениях табака.

Для работы были выбраны гены *CDM44*, *SIMADS5* (Е-активность, подсемейство *SEP3*), *CDM37*, *HAM45*, *HAM59* (С-активность, подсемейство *AG*), *CDM86* и *CDM115* (В-активность, подсемейство *PI/AP3*). Растения табака со сверхэкспрессией ряда выбранных генов были получены ранее, тогда как для генов *SIMADS5*, *CDM86* и *CDM115* были получены плазмидные конструкции, проведена агробактериальная трансформация табака и получены независимые трансгенные регенеранты со сверхэкспрессией генов. Были также проведены эксперименты по скрещиванию ранее полученных растений с целью анализа влияния одновременной сверхэкспрессии нескольких *MADS-box* генов.

Таким образом, исследуемые в работе трансгенные линии табака характеризовались конститутивной экспрессией:

- *SIMADS5* (Е);
- *CDM44*, *HAM45* и *HAM59* (совместная сверхэкспрессия Е + С);
- *CDM37* (С);
- *CDM86* (В₁);
- *CDM115* (В₂);
- *CDM86* и *CDM115* (совместная сверхэкспрессия В₁ + В₂);
- *CDM86*, *CDM115* и *CDM37* (совместная сверхэкспрессия В₁ + В₂ + С).

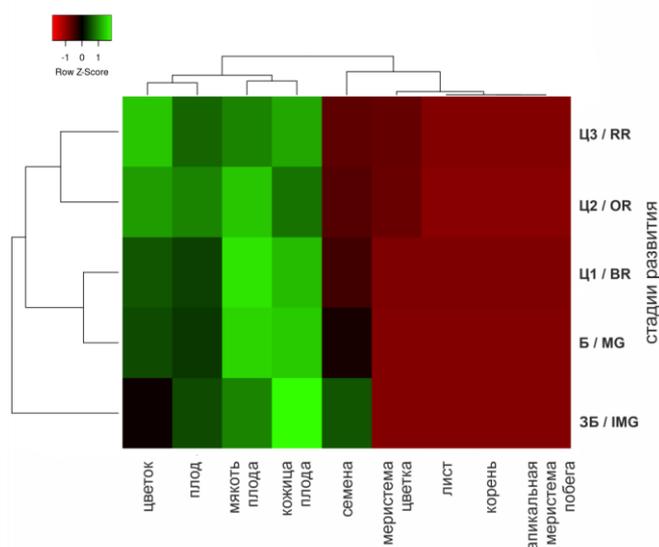
3.2.3. Анализ роли *MADS-box* гена *SIMADS5* в развитии томата *S. lycopersicum*

Ключевым участником всех тетрамерных комплексов являются *MADS*-подсемейства *SEP*, и в основном это *SEP3*-ортологи (раздел 1.3.8). Нами были получены трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена *SIMADS5* томата. Томат, как и табак, входит в семейство Пасленовые, поэтому экспрессия гена томата у табака хоть и является гетерологичной, однако может оказать ощутимый эффект на развитие растения в связи с близким родством видов.

Ген *SIMADS5* представляет кладу *SEP3* и участвует в дифференцировке органов цветка томата, за исключением чашечки (Pnueli et al., 1994). С использованием РНК цветков томата

(сорт *Silvestre recordo*) нами была амплифицирована полноразмерная кДНК гена, которая затем была клонирована в бинарный вектор pGD121 для трансформации растений, а также генов *TAG1* (С-активность) и *FUL2* (А-активность) как предположительных партнеров *SIMADS5*.

Проведенный анализ возможных взаимодействий между белками TAG1, FUL2 и SIMADS5 в двухгибридной GAL4-системе показал, что ТФ SIMADS5 способен димеризоваться с TAGL1 и FUL2, а также обладает активаторными свойствами (Nezhdanova et al., 2021a). Анализ профиля экспрессии *SIMADS5* был первично проведен *in silico*, и наибольшие уровни транскриптов гена соответствовали поздним стадиям развития репродуктивных органов (рис. 25). Это указывает на участие *SIMADS5* и в дифференцировке клеток ЦМ, и в развитии и созревании плода и семян. Полученные результаты подтвердили, что ген *SIMADS5* может выполнять С-функцию в растении томата и повлиять на развитие табака при сверхэкспрессии.



ЗБ – закладка бутона, Б – бутонизация, Ц1-Ц3 – этапы раскрытия цветка; плод IMG – незрелый зеленый, MG – зеленый, финального размера, BR – изменение окраски, OR – оранжевый, RR – спелый

Рисунок 25 – Профиль экспрессии гена *SIMADS5*, представленный в виде тепловой карты, в различных органах растений томата на примере сортов MicroTom и M82

Затем были получены и охарактеризованы трансгенные растения табака *SIMADS5s* (18 регенерантов T₀) и *SIMADSas* (3 регенеранта), которые характеризовались измененными морфологическими параметрами и временем цветения по сравнению с контролем, а также более насыщенной окраской листьев (табл. 7 в Приложении, рис. 26, 28).

В дальнейшем анализе были использованы растения T₁ от линий T₀ *SIMADS5s* с ярко выраженным фенотипом (5-16 и 5-17). Было показано, что исследуемые растения наследуют фенотип родителей, по-прежнему цветут в 1,3-1,5 раза позже контроля и, дополнительно к

родительскому фенотипу, формируют цветки с ярко окрашенным венчиком (маджента vs. светло-розовый у контроля) (табл. 8 в Приложении, рис. 27, 28).

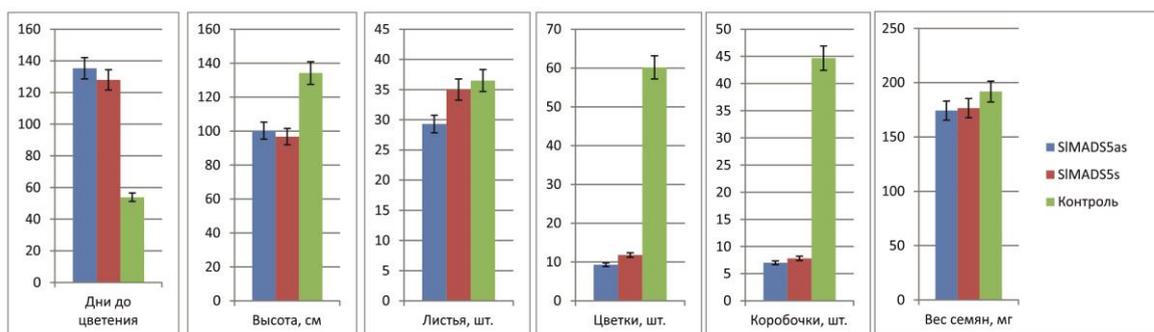


Рисунок 26 – Характеристики трансгенных растений табака T₀ *SIMADS5as* и *SIMADS5s*

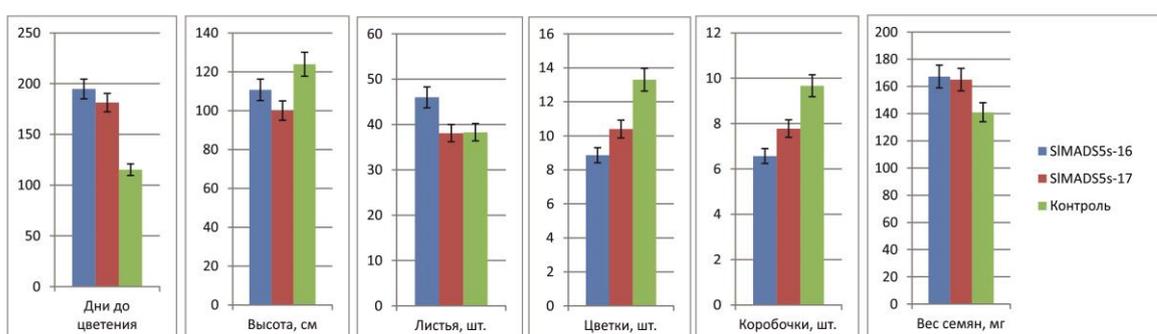


Рисунок 27 – Характеристика растений табака линий 5-16 и 5-17 (T₁ *SIMADS5s*)

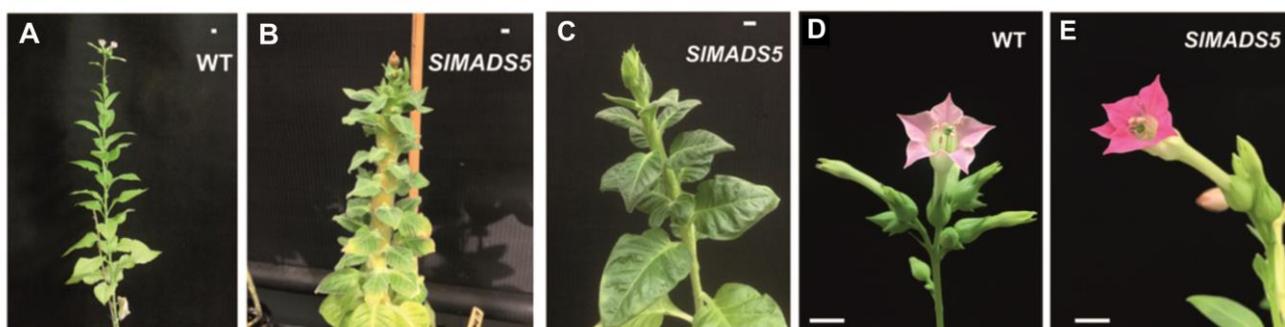


Рисунок 28 – Эффект сверхэкспрессии гена *SIMADS5* на фенотип растения (B–C, E) в сравнении с контролем (WT) (A, F); масштаб = 1 см

Потомки T₂ этих линий уже на стадии проростков отличались почти полным отсутствием междоузлий и погибали до или после пересадки в грунт. Только растения линии 5-16-7 (14 шт.) смогли сформировать функциональный стебель и при развитии повторяли родительский фенотип.

Экспрессия трансгена *SIMADS5* была определена в ткани листьев и АМП у контрольных и трансгенных (T₂ 5-16-7 и 5-17-1) растений. В этих же образцах была охарактеризована экспрессия гена *NtWUS* (участвует в поддержании пула стволовых клеток в АМП и МС/ЦМ) и

генов, связанных с репродуктивным развитием. Среди последних – *NtLFY* и *NtAPI*, которые участвуют в контроле времени инициации цветения (оба гена) и определении идентичности чашечки и венчика (*MADS-box* ген *NtAPI*), а также *MADS-box* гены *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtSEP3* (Е-активность) и *NtAG* и *NtPLE* (С-активность).

Было подтверждено, что мРНК *SIMADS5* присутствует только у 5-16-7 и 5-17-1. Остальные гены экспрессировались сходно низко между образцами; исключение составил высокий уровень транскриптов в репродуктивной меристеме контроля (рис. 29).

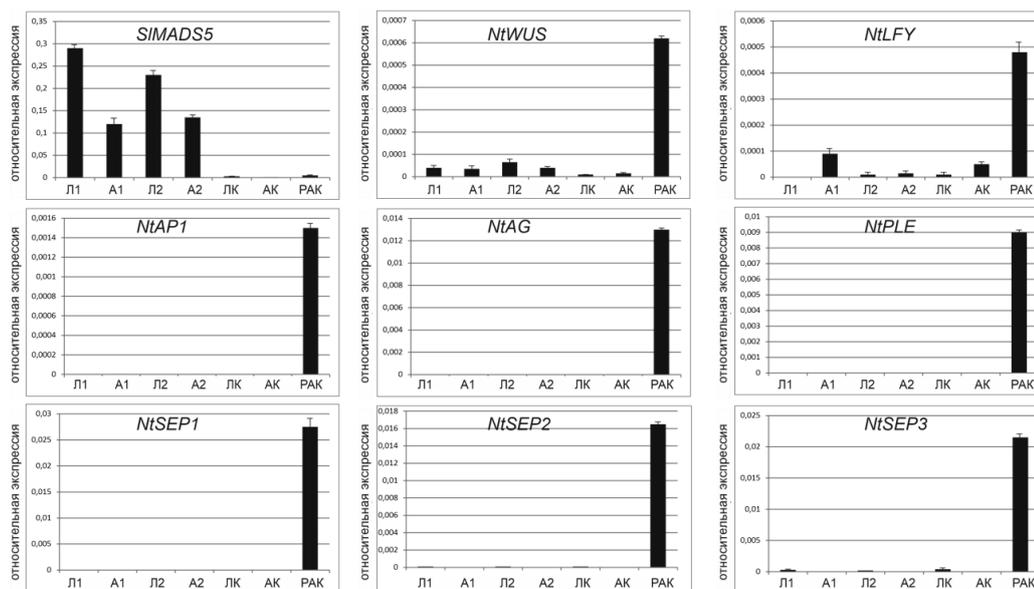


Рисунок 29 – Профиль экспрессии ключевых регуляторных генов в листьях и АМП контрольного (К) и трансгенных (5-16-7 (1) и 5-17-1 (2)) растений; Л – лист, А – АМП, РА – АМП в репродуктивном статусе

Исследования гетерологичной сверхэкспрессии гомологов *SEP3* проводилось ранее на самых разных видах растений, в том числе на модельном виде *A. thaliana* и на табаке (*Nicotiana spp.*). Различались эффекты по отношению ко времени цветения. К примеру, сверхэкспрессия *SEP3* и *FBP2* (*P. × hybrida*) в *A. thaliana* (Pelaz et al., 2001, Ferrario et al., 2003) и *NsMADS3* в *N. sylvestris* (Jang et al., 1999) ускоряет инициацию цветения, тогда как сверхэкспрессия *FBP2* в гомологичной системе (петуния) не влияет на сроки цветения (Ferrario et al., 2006).

В случае сверхэкспрессии *SIMADS5* цветение было сильно отложено, что могло быть связано с некорректным развитием АМП, о чем говорит утолщение стебля и листьев, а также укорочение междоузлий. Мы предполагаем, что данный эффект может быть следствием эктопической экспрессии ТФ *SIMADS5* в АМП, его неспецифических взаимодействий с другими белками и генами и, как следствие, некорректного развития меристемы.

Полученные результаты по характеру экспрессии генов *NtLFY* и *NtAPI* (рис. 29), первый из которых участвует в определении идентичности МС и ЦМ, а второй – ЦМ, предполагают, что только контрольное нетрансгенное растение находится в стадии перехода к цветению, то

есть АПМ становится МС. Одновременно, АМП растения 5-16-7 показала присутствие низкого уровня транскриптов *LFY*, что позволяет говорить об инициации этапа перехода меристемы к репродуктивному статусу. Данный вывод основан на ранее показанной экспрессии гена *LFY* в МС *A. thaliana* при дифференцировке ЦМ (Weigel et al., 1992).

Полученные нами данные по наличию белок-белковых взаимодействий ТФ SIMADS5 с FUL2 (участие в комплексах при созревании плода томата) и TAGL1 (С-активность) согласуются с моделями «Квартет» и ABC(E), а также с литературными данными (Hugouvieux et al., 2018). Они подтверждают совместную роль SIMADS5, FUL2 и TAGL1 в спецификации плодолистиков и терминации развития цветка. Последнее происходит при подавлении экспрессии гена *WUS* в ЦМ совместным действием ТФ AG и других MADS-ТФ (в том числе, E-активности) (Lenhard et al., 2001, Ferrario et al., 2006). При гетерологичной экспрессии SIMADS5 мог бы осуществлять данные функции, конкурируя с SEP3-гомологом табака в тетрамерных комплексах в цветке. Однако в АМП мРНК AG-генов табака не найдена, а экспрессия *NtWUS* у трансгенных растений выше, чем у контроля (кроме МС) (рис. 29). Таким образом, SIMADS5, совместно с неизвестными партнерами, может участвовать в положительной регуляции размера меристемы и задержке цветения, что сказалось на повышенной толщине стебля и листьев и отложенном времени цветения (табл. 8 в Приложении, рис. 26-28).

Отдельно отметим усиление антоциановой окраски лепестков (рис. 28), что предполагает роль *SIMADS5* в положительной регуляции генов пути биосинтеза антоцианов и находится в соответствии с ранее показанной корреляцией уровня транскриптов *SEP*-генов *MrMADS01* и *PaMADS7* с окраской ягод у *Myrica rubra* (Zhao et al., 2019) и *Prunus avium* (Qi et al., 2020).

Поскольку при отсутствии экспрессии гена *SIMADS5* изменяется количество кругов и органов в цветке, и идентичность органов цветка также частично меняется, сделаны выводы о роли *SIMADS5* в определении идентичности цветковых органов (Pnueli et al., 1994). Мы показали, что сверхэкспрессия *SIMADS5* не привела к гомеотическим изменениям в цветке, что может объясняться гетерологичной системой экспрессии. Кроме того, данный факт согласуется с нашими результатами по эффекту от сверхэкспрессии гена хризантемы *CDM44* в табаке (Nezhdanova et al., 2021a).

3.2.4. Сверхэкспрессия *MADS-box* гена *CDM44* в растении табака

Ранее в лаборатории получены трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена *CDM44* (гомологичного *SEP3*), как в смысловой (45 линий T₀), так и в антисмысловой (28) ориентации (не опубликовано). Данные растения отличались от контроля только поздней инициацией цветения и большим количеством цветков в соцветии, что подтвердил дальнейший анализ пяти линий T₁ *CDM44s* (табл. 9 в Приложении, рис. 30).

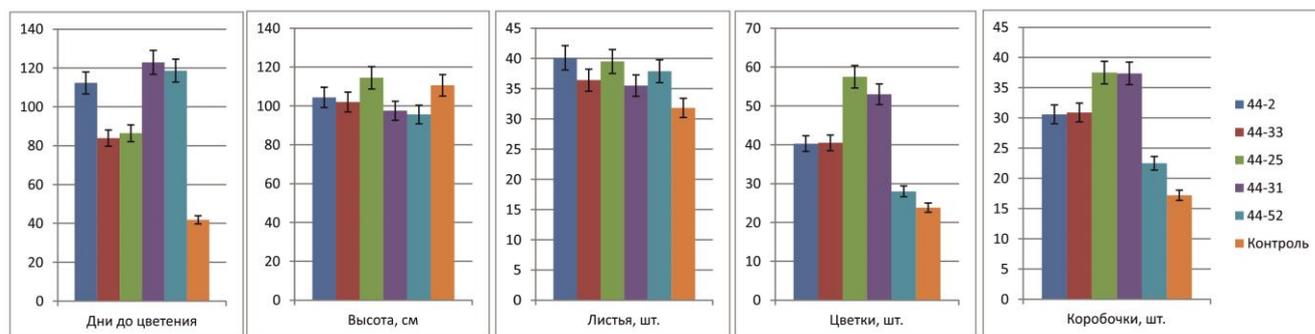
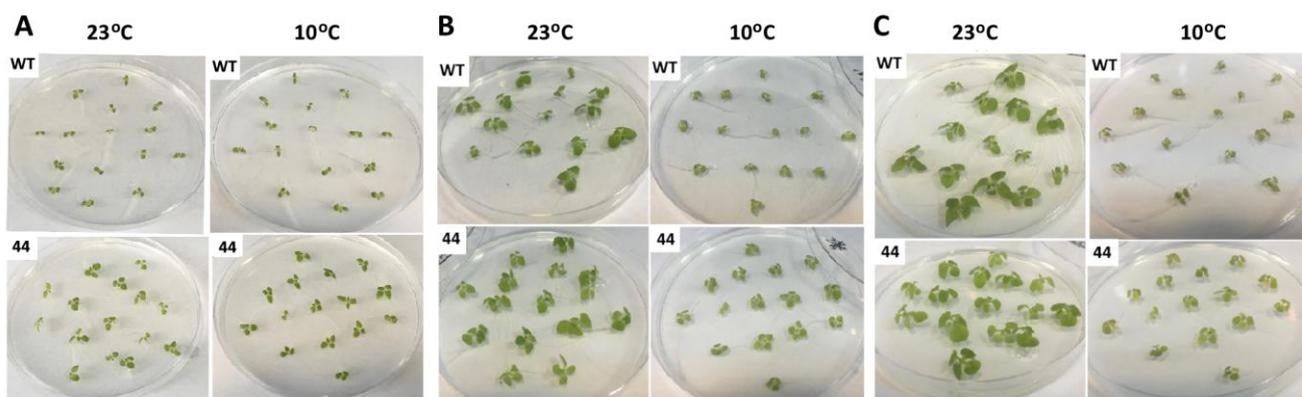


Рисунок 30 – Сравнение характеристик контрольного и трансгенных растений табака T₁ *CDM44s*

Более того, нами было отмечено существенная задержка созревания семенных коробочек (период от незрелого зеленого к полностью сухому, коричневому плоду) у растений *CDM44s* по сравнению с контролем. Причиной этого может быть то, что ТФ подсемейства SEP участвуют в регуляции созревания плода, как показано на примере томата (Slugina et al., 2020c).

Растение T₂ 44-31-6 было использовано нами для скрещивания с растениями табака с одновременной сверхэкспрессией двух генов С-активности подсолнечника (см. раздел 3.2.7). Учитывая, что белки Е- и С-активностей совместно определяют идентичность гинецея и андроцея (согласно моделям «Квартет» и ABC(E)), растения с тройной экспрессией могут иметь значительные изменения фенотипа.

Кроме того, поколение T₃ от линии 44-31-6 было использовано для оценки влияния холодового стресса (30 суток при 10°C) на рост растений. В результате было обнаружено, что растения со сверхэкспрессией *CDM44* обладают повышенной устойчивостью к низким температурам в сравнении с нетрансгенным контролем, для которого были характерны дефицит вегетативной массы, увядание листьев и пониженное накопление хлорофиллов (рис. 31) (Nezhdanova et al., 2021b).



А – чашки с проростками перед переносом на холод: семена проросли в климокамере (23°C) и образовали два истинных листа, после чего половина переселена на 10°C; В – те же чашки через две недели; С – те же чашки через четыре недели

Рисунок 31 – Влияние низкой положительной температуры (10°C) на рост растений табака Т₃ 44-31-6 (44) и нетрансгенного контроля (WT)

3.2.5. Совместная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *HAM45* и *HAM59* в растении табака

Паралогичные *MADS-box* гены *HAM45* и *HAM59* (подсемейство *AG*) (рис. 21) выполняют С-функцию у подсолнечника, о чем свидетельствуют данные ранних исследований линий табака со сверхэкспрессией каждого из этих генов (Сизенева и др., 2013а; Сизенева и др., 2013b). Поскольку данные гены предположительно действуют совместно, мы провели скрещивания отдельных линий и получили растения F₁ и затем F₂ с одновременной сверхэкспрессией *HAM45* и *HAM59*. Среди потомков мы выбрали три линии F₂ (13-1-1, 13-1-4 и 13-1-7) с наиболее яркими отличиями от нетрансгенного контроля.

Прошедшие полный цикл развития растения F₃ от выбранных трех линий были охарактеризованы (табл. 10 в Приложении, рис. 32). Было обнаружено, что большинство растений цвели позже контроля и притом существенно отставали в росте. Некоторые из них также обладали пониженной фертильностью (0–1 коробочка при искусственном опылении и в ~2-3 раза меньше семян) (табл. 10 в Приложении).

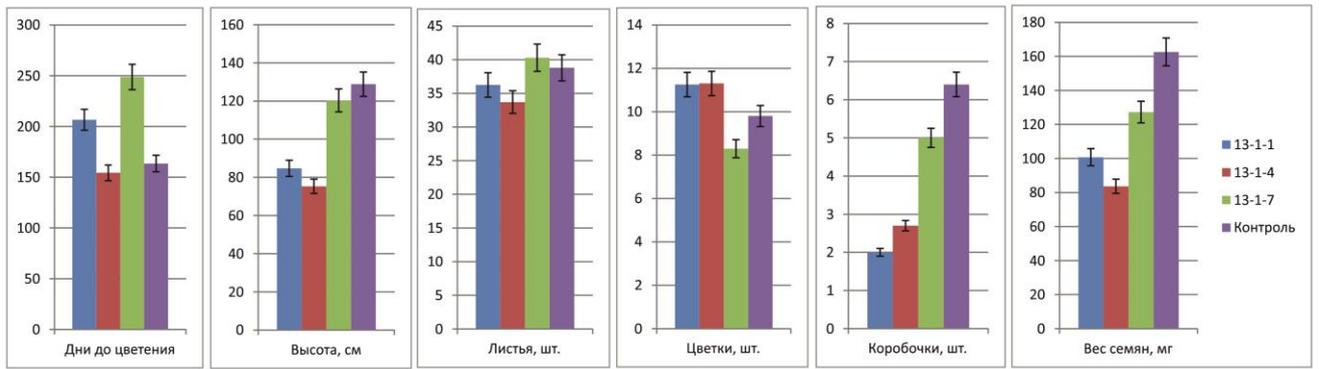


Рисунок 32 – Сравнение морфологических параметров контрольных и трансгенных (*HAM45s* x *HAM59s*) растений табака

Таким образом, одновременная сверхэкспрессия двух генов *HAM45* и *HAM59*, предположительно совместно определяющих С-активность у подсолнечника, способствовала увеличению длительности периода вегетации растения. Чашелистики и лепестки цветков таких растений частично меняли идентичность с приобретением некоторых признаков плодolistиков и тычинок, соответственно. Это согласовалось с фенотипом родительских растений со сверхэкспрессией *HAM45* (Шульга и др., 2015). Пониженная фертильность таких растений выражалась в уменьшенном количестве пыльцы и плохом раскрытии пыльников. Кроме того, более короткие (*vs* контроль) нити тычинок и более узкая трубка венчика (рис. 33) усложняли процесс самоопыления.



Рисунок 33 – Изменения в морфологии цветков контрольного (WT) и трансгенных (*HAM45s*; *HAM59s*; *HAM45s* x *HAM59s*) растений табака

На основании моделей «Квартет» и ABC(E) (раздел 1.3.2) можно ожидать, что при совместной сверхэкспрессии двух С-генов во всех кругах цветка будут формироваться тетрамеры ССЕЕ, СЕВ₁В₂ и ССЕD. Вследствие этого околоцветник таких растений будет приобретать признаки репродуктивных органов, что и произошло в нашем случае (рис. 33). Изменения, наблюдаемые в гинецее и андроцее цветка табака, могут быть результатом конкурирования С-белков подсолнечника с С-белками табака за вхождение в регуляторные комплексы в сочетании с вариабельностью последовательности, которая не позволяет полноценное осуществление С-функции гетерологичными белками в табаке.

Ранее были сделаны предположения, что *НАМ59* может определять закладку ЦМ, а *НАМ45* – плодолистиков и тычинок, и таким образом каждый из генов выполняет свою часть С-функции (Сизенева и др., 2013а; Сизенева и др., 2013b). Полученные нами данные по влиянию одновременной сверхэкспрессии генов *НАМ45* и *НАМ59* на структуру цветка табака служат подтверждением предполагаемой роли генов в осуществлении С-функции. Изменение времени инициации цветения – свидетельство влияния на идентичность репродуктивной меристемы, тогда как изменения идентичности органов цветка – подтверждение роли *НАМ45* в спецификации этих органов. Мы также предполагаем, что подобное функциональное разделение существует у всех видов *Asteraceae*, так как гомологи *НАМ45* и *НАМ59* имеются у хризантемы и герберы (рис. 21), и функционально они сходны. К примеру, проявления сверхэкспрессии генов *НАМ45* и *СDM37* (ортологичного *НАМ45*) в табаке очень похожи (раздел 3.2.6; Щенникова и др., 2011; Сизенева и др., 2013а; Сизенева и др., 2013b).

3.2.6. Сверхэкспрессия *MADS-box* гена *СDM37* в растении табака

Растения для исследования выбирали среди ранее полученных линий со сверхэкспрессией гена *СDM37* (Щенникова и др., 2011). Ими стали линии 37-33 (Т₁), сходная с контролем, и 37-1-7-8 (Т₃), существенно отличающаяся от контроля. Мы провели анализ по 10 растений поколения Т₂ и Т₄, соответственно, с последующим отбором наиболее интересных образцов (табл. 11 в Приложении, рис. 34).

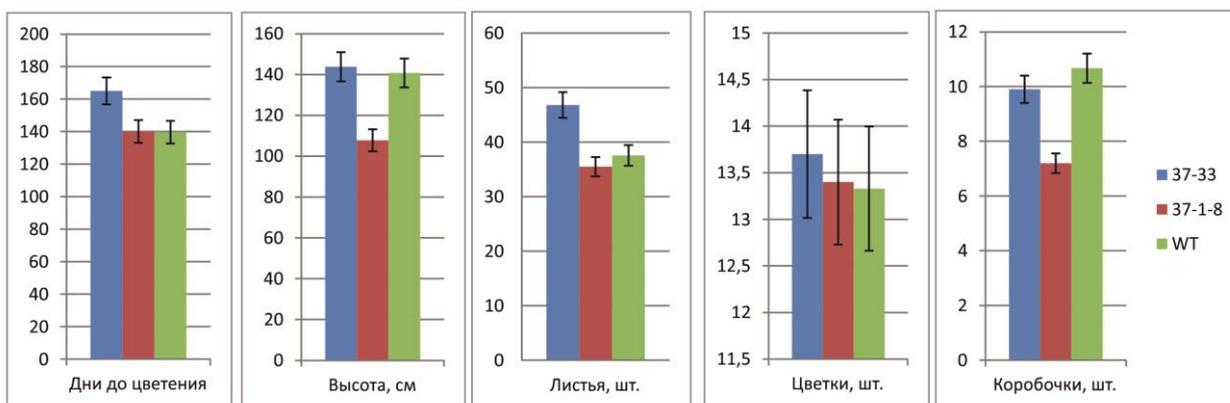


Рисунок 34 – Характеристики потомков линий 37-33 и 37-1-7-8 в сравнении с контролем

Было показано, что потомки линии 37-33 отличаются от контроля только по количеству листьев и времени цветения (рис. 34). В то же время потомки линии 37-1-7-8 имели сильные отклонения в морфологии цветка, однако в вегетативной части существенно отличались от контроля по высоте и количеству семенных коробочек (рис. 34, 35). Андроцей цветка 37-1-7-8 характеризовался укороченными тычиночными нитями, пыльники тычинок плохо раскрывались и производили меньше пыльцы. Околоцветник имел заметные признаки репродуктивных органов: структуры, подобные пыльникам и стигме на верхних долях лепестков и чашелистиков, соответственно; эктопические нектарники, которые выделяли нектар, в основании чашелистиков. Сужение трубки венчика приводило к искривлению тычиночных нитей, препятствуя самоопылению.

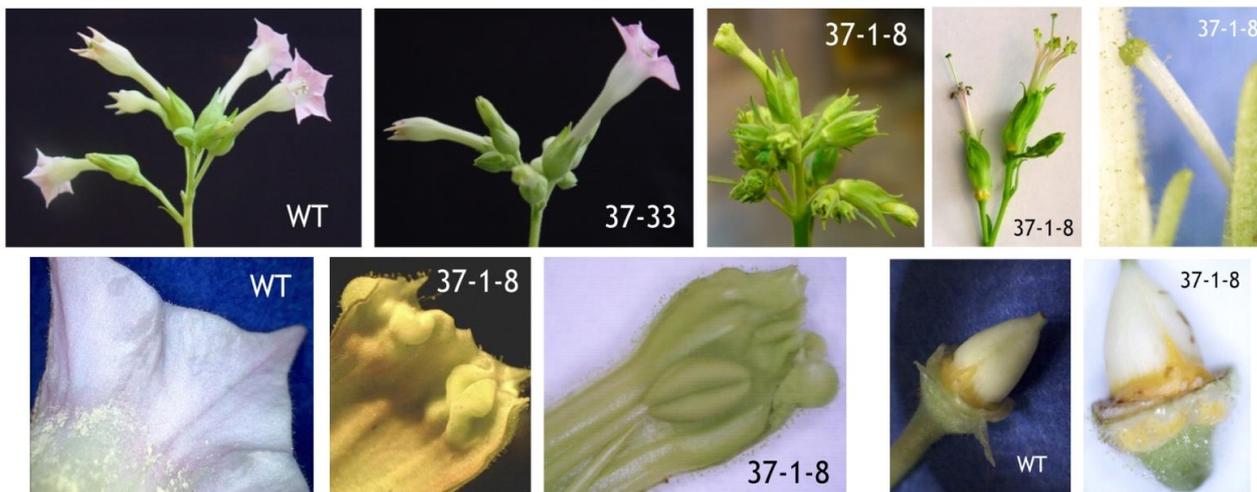


Рисунок 35 – Соцветия и цветки контрольного нетрансгенного (WT) и трансгенных (37-33, 37-1-7-8) растений табака

Наблюдаемые изменения у линии 37-1-7-8 (но не 37-33) соответствовали ожиданиям, основанным на модели ABC(E). Распространение домена С-активности, в норме ограниченного репродуктивными органами, на околоцветник могло способствовать конкуренции В-белков

табака с С-белком хризантемы за место в регуляторных комплексах и, вследствие этого, к частичному изменению идентичности лепестков и чашелистиков.

Кроме ярко выраженных проявлений влияния сверхэкспрессии *CDM37* на фенотип цветка 37-1-7-8, среди анализируемого поколения T₄ были растения и с меньшим эффектом. Причиной этого может быть гетерозиготное состояние трансгена. Также, это может быть следствием гетерологичной экспрессии гена, когда *CDM37* не может в полной мере функционально заменить С-белок табака. Действительно, сходство *CDM37* и С-белка *N. tabacum* составляет всего 74% (NCBI-BLAST), причем наибольшая вариабельность показана для С-области ТФ, которая ответственна за функциональную активность.

Примером гетерологичной экспрессии С-генов в растениях табака является сверхэкспрессия гена *PLE* (*A. majus*), которая приводила к сходным с 37-1-7-8 преобразованиям цветка (Davies et al., 1996). Однако фенотип 37-1-7-8 (рис. 34, 35) был выражен слабее, чем в случае 35S::*PLE* (Davies et al., 1996), что можно объяснить большим сходством белковых последовательностей *PLE* и *NTPLE* (гомолог *AG* у *N. tabacum*), нежели *CDM37* и *NTPLE*.

У хризантемы, кроме *CDM37*, имеется второй представитель подсемейства *AG* – *StoMADS* (BCJ88659.1), который является структурным и, вероятно, функциональным гомологом *HAM59* подсолнечника (рис. 21) и, по всей видимости, служит второй компонентой активности С-класса у хризантемы.

3.2.7. Совместная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *CDM44*, *HAM45* и *HAM59* в растениях табака

Образцы линий 13-1-1 (*HAM45s* x *HAM59s*; раздел 3.2.5) и 44-31-6 (*CDM44s*; раздел 3.2.4) были скрещены, и полученные растения F₁ охарактеризованы. Среди них были отобраны три образца со сверхэкспрессией всех трех генов. Анализ поколения F₂ образцов позволил отобрать линию 13-1-1 для дальнейшего исследования. Среди потомков F₃ этой линии были выбраны и проанализированы три растения (13-1-1-17, 13-1-1-64 и 13-1-1-82) поколения F₄. Было показано, что две из трех линий зацветали позже, и отдельные растения незначительно отличались от контроля количеством цветков/коробочек (табл. 12 в Приложении, рис. 36).

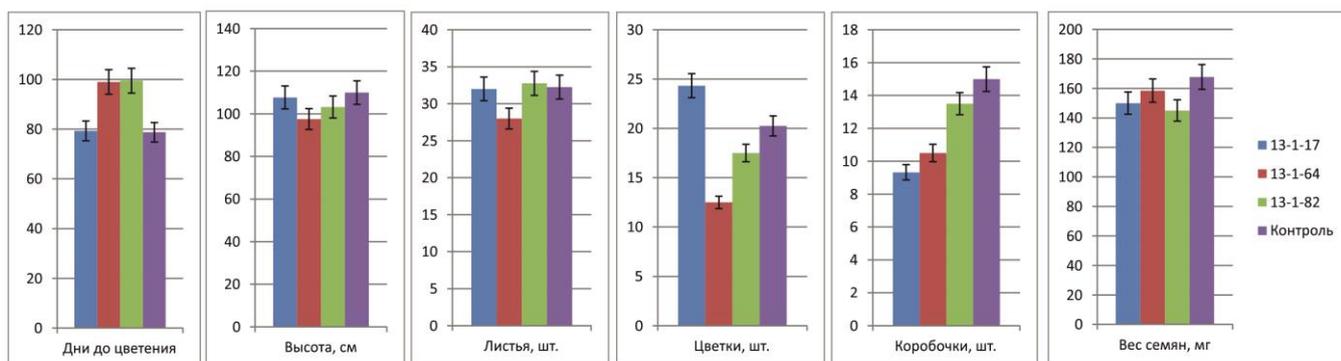


Рисунок 36 – Сравнение характеристик контрольного и трансгенных растений табака F₄ *HAM45s* x *HAM59s* x *CDM44s*

Растения F₄ *HAM45s* x *HAM59s* x *CDM44s* сохранили фенотип родительской линии 13-1-1 (рис. 37).



Рисунок 37 – Цветки контрольного (WT) и трансгенных (*HAM45s* x *HAM59s*; *HAM45s* x *HAM59s* x *CDM44s*) растений табака

На основании моделей «Квартет» и ABC(E) можно было ожидать, что при одновременной сверхэкспрессии двух C-генов и гена, ортологичного *SEP3*, во всех кругах цветка будут формироваться тетрамеры CCEE, CEB₁B₂ и CCED, и это будет приводить к гомеотическим изменениям околоцветника. Наблюдаемый нами фенотип повторяет фенотип родительских растений *HAM45s* x *HAM59s*, то есть сверхэкспрессия *CDM44* не сказалась на развитии растений, что может быть следствием гетерологичной экспрессии гена *CDM44*.

3.2.8. Индивидуальная и одновременная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *CDM86* и *CDM115* в растениях табака

Были получены трансгенные растения T₀ табака с индивидуальной сверхэкспрессией генов B-активности: *CDM86* в смысловой (26 регенерантов) и антисмысловой (24) ориентации, и *CDM115* в смысловой ориентации (26). Растения T₀ *CDM86s* и *CDM115s* существенно различались с контролем по времени цветения и количеству цветков и семян (табл. 13, 14 в Приложении, рис. 38), тогда как *CDM86as* не имели отличий.

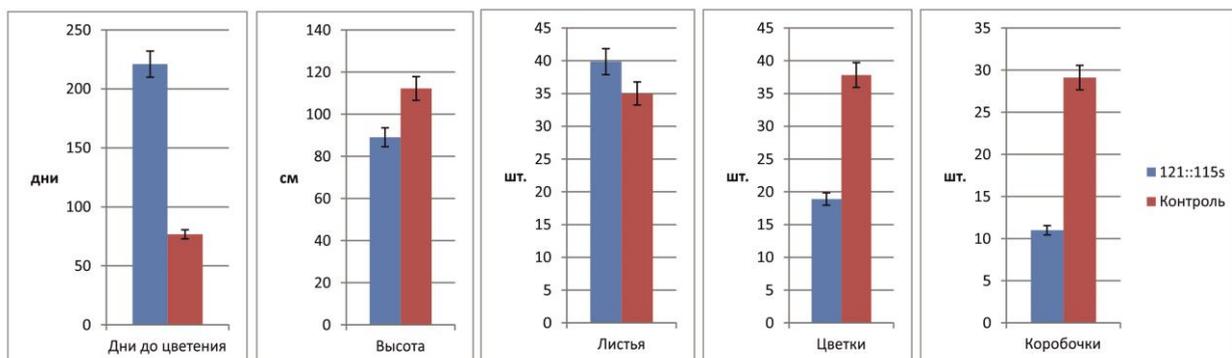
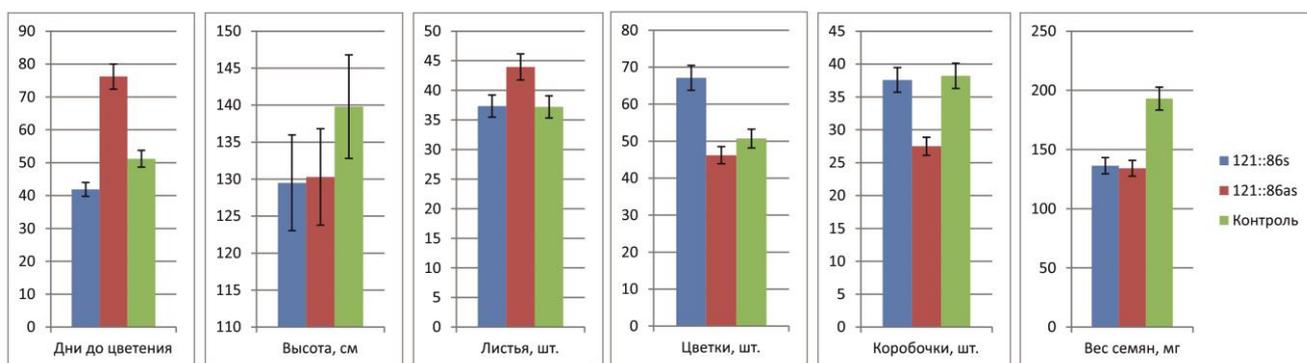


Рисунок 38 – Характеристики регенерантов табака T₀ CDM86s и CDM115s

Среди полученных растений T₀ CDM86s и CDM115s были отобраны, соответственно, пять и четыре линии. Анализ их потомков (T₁) показал, что все они цветут позже контроля, причем наиболее выражено это у растений CDM115s; также имеются и другие морфологические изменения (табл. 15 в Приложении, рис. 39). Трансгенный фенотип между отдельными линиями различался экспрессивностью. К примеру, время цветения растений линий 88 и 36 было самым поздним по отношению и к контролю, и к другим проанализированным линиям CDM86s; кроме того, именно эти две линии давали наименьшее количество коробочек и семян (табл. 15 в Приложении).

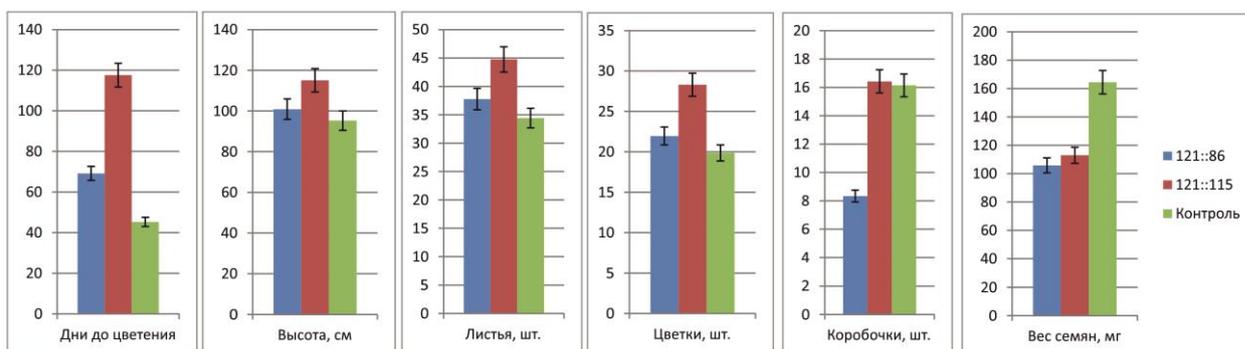


Рисунок 39 – Характеристики растений T₁ CDM86s и CDM115s

Помимо вегетативных отличий мы наблюдали изменения в строении цветка у некоторых из растений CDM86s (рис. 40). Это касалось завязи пестика, которая частично меняла свою

идентичность, сохраняя при этом фертильность (то есть формировались функциональные семязачатки). Характер изменений позволил предположить, что вокруг завязи формируется дополнительная трубка венчика с цветоножкой, появление которой визуалью удлиняет завязь (рис. 40). В то же время цветки растений *CDM115s* не отличались внешне от контроля.

На основании полученных данных среди растений T₁ были выбраны образцы 3-1, 88-117 и 36-3 (*CDM86s*) и 4-26, 11-52 и 22-171 (*CDM115s*) для скрещивания с целью получения растений с одновременной сверхэкспрессией обоих генов В-активности. Критерием для отбора стало время цветения, наиболее близкое к контролю (в том числе, для удобства скрещивания), в сочетании со сниженным количеством семян (свидетельство влияния сверхэкспрессии трансгена). Также, в случае *CDM86s* учитывалось наличие изменений в идентичности органов цветка.



Рисунок 40 – Цветок и соцветие растений *CDM86s*

В результате скрещивания были получены пять линий F₁ (1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, табл. 16 в Приложении) с подтвержденным присутствием кассет экспрессии обоих трансгенов в геноме растений. Анализ потомства F₂ этих линий показал, что в сравнении с контролем растения 1-1 цвели значительно позже (в ~4 раза), были выше, формировали больше листьев и, при этом, в ~2 раза меньше коробочек и семян. Остальные линии зацветали позднее контроля в ~2-3 раза и образовывали в ~2 (1-2, 3-1) или 4 (2-1) раза меньше коробочек и семян, или в ~2/4 раза меньше коробочек/семян (2-2) (табл. 16 в Приложении, рис. 41).

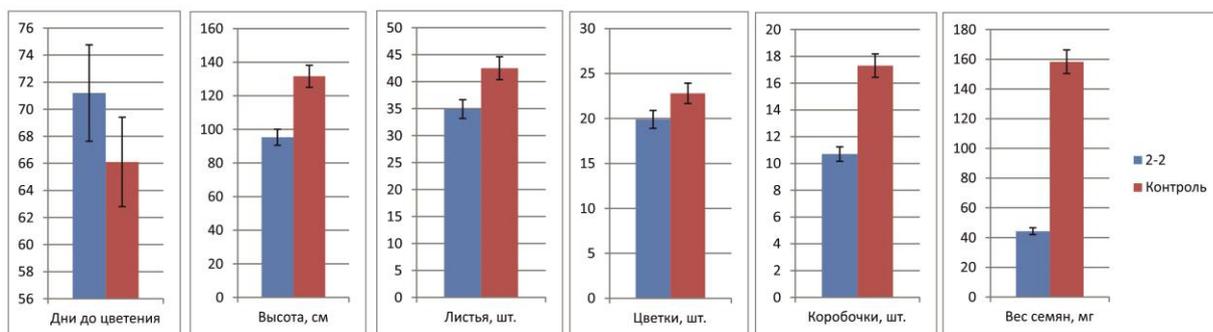


Рисунок 41 – Характеристики растений 2-2 (F_2) *CDM86s* x *CDM115s*

Линия F_2 от 2-2 выделялась не только временем цветения (наиболее близким к контролю), но и по наименьшим количеством семян среди линий. Более того, цветки растений F_2 2-2 демонстрировали наибольшие в сравнении с контролем и другими линиями изменения морфологии, наследуемые по линии *CDM86s*. Причем экспрессивность данных признаков повысилась: чашечка чашелистиков приобрела бледную окраску и форму, сходную с лепестковым венчиком; отсутствовали нектарники (рис. 42). По всей видимости, усиление эффекта произошло за счет добавления экспрессии *CDM115* и формирования полноценного гетеродимера *CDM86/CDM115*.

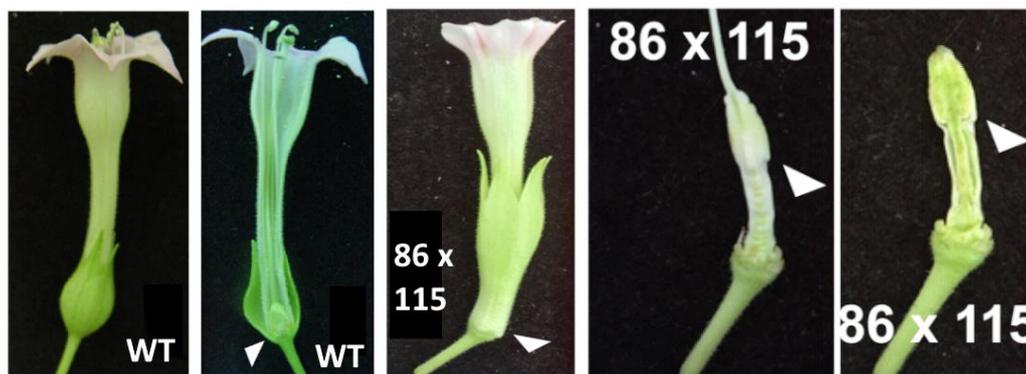


Рисунок 42 – Соцветия и цветки контрольного (WT) и трансгенных (F_2 2-2, *CDM86* x *CDM115*) растений табака

Согласно моделям «Квартет» и ABC(E), ТФ подсемейства PI/AP3 (B-активность) образуют гетеродимер ($B_1 + B_2$), который входит в состав тетрамеров, определяющих закладку лепестков (AB_1B_2E) и тычинок (CB_1B_2E). Мы предполагаем, что *CDM86* (PI, B_1) и *CDM115* (AP3, B_2) при одновременной сверхэкспрессии могут формировать гетеродимер (B_1B_2), в том числе в домене чашелистиков и пестика (где в норме его нет), что приводит к изменениям их идентичности (приобретению признаков лепестков и тычинок) (Wuest et al., 2012). Наши данные (рис. 42) согласуются с другими исследованиями, где на примере *A. thaliana* показано, что сверхэкспрессия генов B-активности приводит к образованию цветков, состоящих из двух кругов лепестков и двух кругов тычинок, при этом «тычинки» круга 4 имеют и признаки

плодолистиков (Jack et al., 1994; Wuest et al., 2012). Известны также примеры влияния гетерологичной экспрессии В-генов на морфологию цветка табака, сходные с нашими данными: сверхэкспрессия в табаке В-генов львиного зева (*A. majus GLO* и *DEF*) меняет идентичность чашелистиков и пестика (Davies et al., 1996). Несмотря на то, что *A. majus* относится к группе Lamiids в отделе Asterids и ближе таксономически к табаку (Solanaceae), а хризантема представляет параллельную группу Asterids – Campanulids, чашелистики и пестик 35S::*GLO* x 35S::*DEF* имеют фенотип (Davies et al., 1996), сходный с фенотипом F₂ 2-2 (рис. 42). Клетки у основания пестика 35S::*GLO* x 35S::*DEF* имеют признаки трихом и борозчатых клеток, характерных для тычиночных нитей (Davies et al., 1996), что (в сочетании со сходством трансгенных фенотипов) свидетельствует о частичной смене идентичности пестика на тычинки у растений F₂ 2-2 (рис. 42). При этом в отличие от стерильных семязачатков 35S::*GLO* x 35S::*DEF* (Davies et al., 1996), семязачатки F₂ 2-2 сохраняли фертильность, хотя количество образующихся семян существенно снизилось (табл. 16 в Приложении, рис. 41). Возможно, различия в степени смены идентичности семязачатками отражают степень филогенетического родства видов в рассматриваемых двух случаях.

Действительно, последовательности белков NtGLO (NP_001313154.1) и NtDEF (NP_001312649.1) обладают большим сходством с GLO (~71%) и DEF (~84%), соответственно, чем с CDM115 (~52%) и CDM86 (~57%). Помимо этого, в С-концевой области CDM86 отсутствует 15ао-последовательность (что свойственно гомологам GLO и других видов Asteraceae, таких как *G. hybrida* и *H. annuus*), которая характерна для NtGLO и GLO и, возможно, влияет на выполнение функции.

Основываясь на полученных результатах, для дальнейших исследований нами была выбрана линия F₂ 2-2-13, которая зацветала немногим позже контроля, однако давала существенно меньше цветков (в ~2 раза) с измененным фенотипом, а также меньше коробочек (в ~2 раза) и семян (в ~4 раза).

3.2.9. Одновременная сверхэкспрессия трёх *MADS-box* генов *CDM37*, *CDM86* и *CDM115* в растениях табака

Растения F₂ 2-2-13 (*CDM86s* x *CDM115s*) были скрещены с растениями T₄ линии 37-1-7-8-4 (*CDM37s*; давали значительно меньше коробочек, чем контроль) – реципрокные скрещивания № 13-2 и 13-5. В результате были получены линии с одновременной сверхэкспрессией трех *MADS-box* генов хризантемы (B₁ + B₂ + C). Растения F₂ от 13-2 и 13-5 цвели значительно позже контроля, были короче и давали меньше цветков, коробочек и семян (табл. 17 в Приложении, рис. 43).

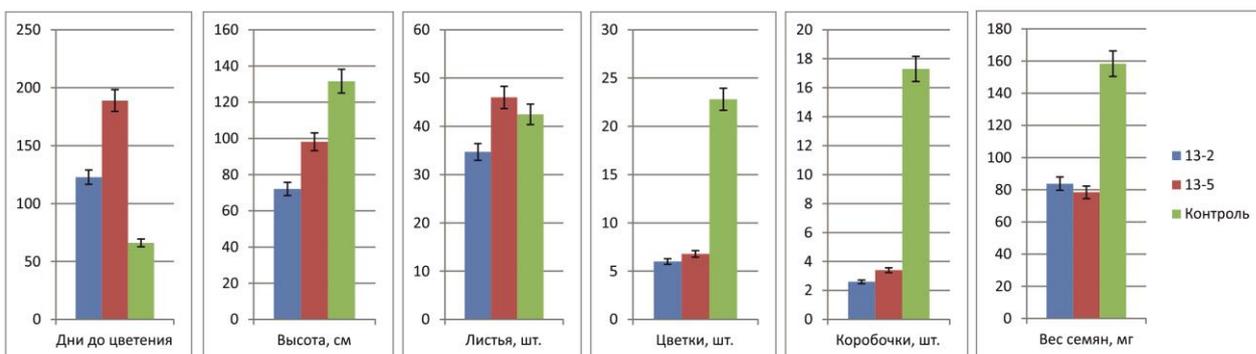


Рисунок 43 – Характеристики растений табака F₂ CDM86s x CDM115s x CDM37s

Дальнейший анализ был проведен на линиях F₃ 13-2-3 (6 растений) и 13-2-7 (11 растений) (табл. 18 в Приложении). В сравнении с контролем изучаемые растения цвели почти в 2 раза раньше, были существенно короче и формировали значительно больше цветков в соцветии, однако обладали пониженной фертильностью (табл. 18 в Приложении, рис. 44). Из-за последнего значительную часть растений пришлось опылять искусственно, и даже в этом случае количество образующихся семенных коробочек было минимальным.

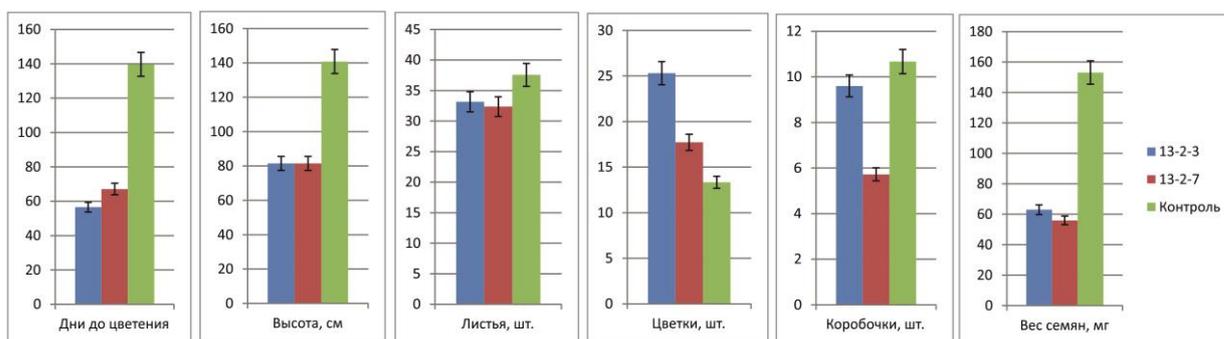


Рисунок 44 – Характеристики растений табака поколения F₃ CDM86s x CDM115s x CDM37s

Таким образом, одновременная сверхэкспрессия генов В- и С-активности влияла на время инициации цветения, морфологию вегетативной части растения и его фертильность. Для цветков линий F₃ 13-2-3 и 13-2-7 были характерны все проявления родительских фенотипов (CDM86s x CDM115s; CDM37s) с усиленным изменением чашечки, которая еще больше стала похожа на венчик (рис. 45), а также с еще более сниженной фертильностью.

Согласно моделям «Квартет» и ABC(E), продукты генов CDM86, CDM115 (В₁В₂) и CDM37 (С) при совместной сверхэкспрессии могут участвовать в комплексах, ответственные за лепестки (АВ₁В₂Е), тычинки (СВ₁В₂Е) и плодолистики (ССЕЕ), с конкурирующим участием соответствующих гомологов табака. Эти комплексы могут распространяться на эктопические домены (например, комплексы с В-генами – на пестик и чашелистики, или С-комплекс – на околоцветник) и, как следствие, сказываться на фенотипе всех органов цветка. Действительно,

полученные нами растения формировали чашелистики с признаками лепестков, лепестки с признаками тычинок, тычинки с признаками лепестков и пестик с признаками лепестков и тычинок (рис. 45).

Интересно, что комбинаторная сверхэкспрессия *MADS-box* генов АВСЕ-активностей в гомологичной системе (*A. thaliana*), кроме идентичности органов цветка, изменяет морфологию вегетативных листьев (Honma and Goto, 2001). А именно, в случае растений 35S::*PI*;35S::*AP3*;35S::*API* (A₁B₂) или 35S::*PI*;35S::*AP3*;35S::*SEP3* (B₁B₂E) листья становятся похожи на лепестки, а в случае 35S::*PI*;35S::*AP3*;35S::*SEP3*;35S::*AG* (B₁B₂EC) – на тычинки (Honma and Goto, 2001). Однако в нашем исследовании листья растений 13-2-3 и 13-2-7 (B₁B₂C) и их родителей (B₁B₂ и C) идентичность не меняли, что может быть следствием как отсутствия белка E-активности, который служит объединению MADS-ТФ в комплексы (Immink et al., 2010), так и гетерологичной системы экспрессии.



Цветки родительских линий 37-1-7-8-4 (A) и 2-2-13 (B). C – цветок F₃ 13-2-3 и 13-2-7. D – лепестки с признаками тычинок (13-2-3 и 13-2-7). E – завязь контроля. F, G – завязь пестика (13-2-3 и 13-2-7)

Рисунок 45 –Цветок при одновременной сверхэкспрессии генов В- и С-активности

3.3 Участие *MADS-box* генов в стрессовых реакциях растений

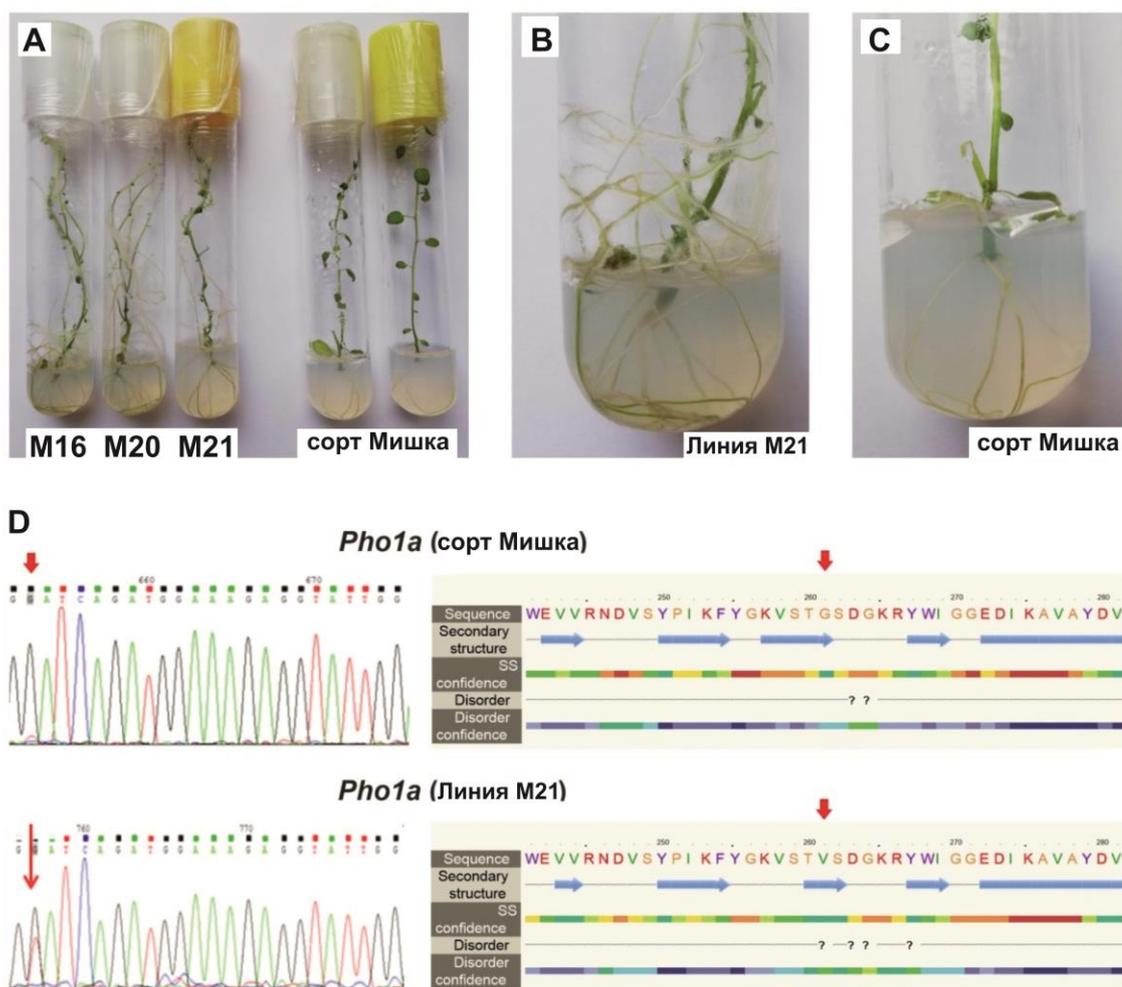
Регуляция многих генов метаболических путей растений находится под контролем *MADS-box* ТФ (раздел 1.5.1). В то же время с модуляцией содержания различных метаболитов (в частности, углеводов, каротиноидов) всегда связана стрессовая реакция растений, что предполагает значимое участие *MADS-box* ТФ в регуляции данной реакции. Поэтому в третьей части нашей работы был проведен анализ экспрессионного ответа *MADS-box* генов на имитацию стрессового воздействия путем получения растений картофеля и табака с измененным метаболизмом крахмала или каротиноидов.

3.3.1. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях картофеля *S. tuberosum* с измененным метаболизмом крахмала за счет внесения мутации в последовательность гена пластидной крахмалфосфорилазы *PHO1a*

Известными мишенями *MADS-box* ТФ являются гены метаболизма углеводов, которые теснейшим образом ассоциированы с приспособлением растений к любым стрессовым условиям. Защитная реакция растений всегда связана с модуляцией содержания растворимых сахаров, что опосредуется не только гидролизом сахарозы, но также деградацией крахмальных гранул, осуществляемой амилазами (гидролиз) и крахмалфосфорилазами (фосфоролит) (Shoaib et al., 2021). Примером участия в стрессовом ответе ферментов метаболизма крахмала является положительная зависимость между содержанием редуцирующих сахаров и уровнем экспрессии пластидной крахмалфосфорилазы *PHO1a* в клубнях картофеля при пониженных температурах (Schreiber et al., 2014; Slugina et al., 2020a).

Мы получили трансгенные растения четырех сортов картофеля *S. tuberosum* с измененным обменом крахмала за счет редактирования (CRISPR-Cas9) последовательности гена *PHO1a* (NCBI Gene ID: 101252851) и определили в этих растениях экспрессию *MADS-box* генов, которые могут быть связаны с ответом растения на стресс.

Для этого в последовательности гена *PHO1a* был выбран участок 5'-gatcagatggaagaggattgg-3' (положение 782–804 н в кодирующей последовательности) для использования его в качестве гРНК (гидовой РНК), собрана конструкция для редактирования и получен рекомбинантный штамм агробактерии. Проведена агробактериальная трансформация стеблевых эксплантов картофеля и получено 39 трансгенных регенерантов T₀ сорта Мишка (6 линий), Люкс (17), Терра (11) и Жуковский ранний (5). Все растения отличались от исходных сортов повышенной стимуляцией корне- и побегообразования (рис. 46, А–С).



(A-C) Редактированные растения M16, 20 и 21 в сравнении с исходным сортом Мишка. (D) Участок gRNA в кДНК *PHO1a* (дикого типа и редактированный) (слева) и соответствующая вторичная структура белка согласно Phyre2 (справа). Стрелки указывают на введенную мутацию

Рисунок 46 – Морфологические и генетические эффекты редактирования гена *PHO1a*

Секвенирование целевого сайта *PHO1a* показало его идентичность у исходных сортов картофеля, тогда как у редактированных линий (все 39) данный участок соответствовал двум аллельным вариантам – дикого типа и редактированному (несинонимичная мутация 782g→t) (рис. 46, D). Данный участок кДНК был амплифицирован, клонирован и секвенирован (по 10 клонов для каждой линии) и было выявлено, что 20–60% клонов содержат 782g→t. Никаких других генетических изменений обнаружено не было, что указывает на связь мутации 782g→t с измененным фенотипом трансгенных растений.

Структурный анализ показал, что 782g→t приводит к радикальному замещению G261V в N-концевом функциональном домене GT35_Glycogen_Phosphorylase крахмалфосфорилазы, расположенном перед каталитическим центром. Согласно предсказанию (Phyre2), данная мутация изменяет размер одной из β-складок во вторичной структуре белка РНО1а (рис. 46,

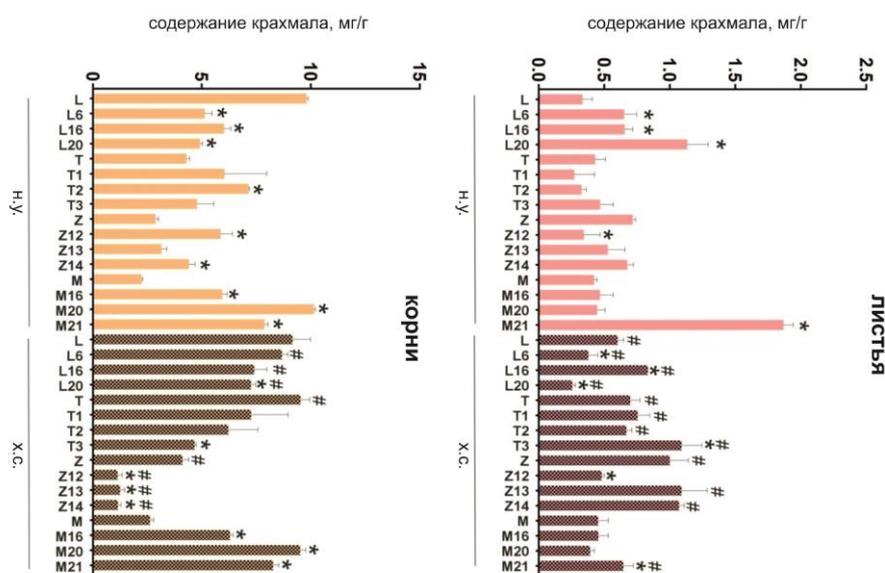
D). Однако позиционно замещение не соответствует каким-либо каталитическим или субстрат-связывающим сайтам.

Заметим, что в других исследованиях авторам удавалось отредактировать все аллели целевых генов в тетраплоидном геноме *S. tuberosum* (например, Kusano et al., 2018). В нашем случае у полученных линий были отредактированы, предположительно, 1–2 аллеля из четырех. То, что кроме данной мутации мы не обнаружили других событий редактирования *PNO1a*, а замещение G261V не связано с каталитически важными участками фермента, позволило предположить возникновение при редактировании и других мутаций, кроме 782g→t, которые, однако, приводили к нежизнеспособности растения. В соответствии с этим находится факт, что даже одна мутация (G261V) вызвала значительные морфологические изменения (рис. 46, A–C), которые могут быть результатом нарушений метаболизма крахмала, являющегося одним из основных источников энергии для растения (Smith and Zeeman, 2020).

Мы сравнили содержание крахмала в корнях и листьях контроля и отредактированных линий в нормальных условиях роста (21°C) и в ответ на холодовой стресс (4°C, 3 дня). Для этого были отобраны линии с наиболее выраженными морфологическими отклонениями от исходных сортов: L6, 16 и 20 (Люкс); T1–T3 (Терра), Z12–14 (Жуковский ранний); и M16, 20 и 21 (Мишка). Было обнаружено, что в листьях при нормальной температуре концентрация крахмала уменьшается (T2 и Z12), увеличивается (M21) или остается на уровне сорта (все L-линии). При этом в корнях наблюдается снижение (L-линии), рост (T2, Z12, Z14, M-линии) или сохранение (T1, T3 и Z13) (рис. 47). Таким образом, различия наблюдались между сортами, сортами и линиями, линиями, а также листьями и корнями. Значимых закономерностей обнаружено не было, за исключением L-линий (у всех количество крахмала увеличилось в листьях и уменьшилось в корнях) M-линий (у всех содержание крахмала повысилось в корнях).

Наблюдаемые различия и отсутствие очевидных закономерностей говорит о генотип-специфичности регуляции углеводного обмена, а также может быть следствием локализации кассеты для редактирования в геноме, различий по числу мутантных аллелей и мозаичности редактирования.

В согласии с этим краткое холодовое воздействие приводило к снижению содержания крахмала в корнях сортов Терра и Жуковский ранний и увеличению его в листьях сортов Люкс, Терра и Жуковский ранний (рис. 47). В то же время у отредактированных линий количество крахмала в корнях увеличивалось (L) или уменьшалось (Z), а в листьях повышалось (L16, T3 и M21) или снижалось (L6, L20 и M21) (рис. 47).

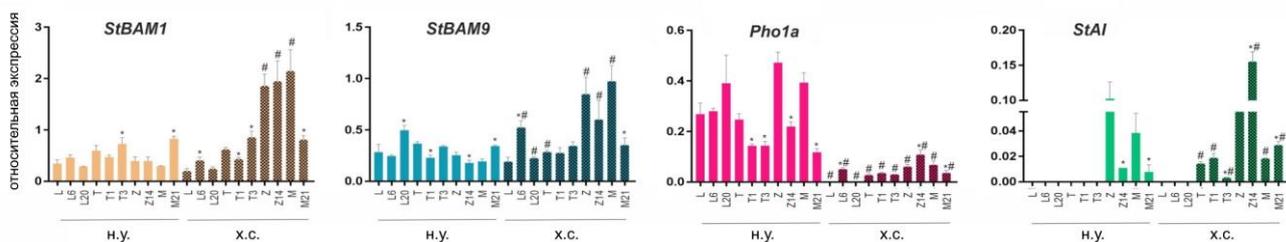


Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 3$); * $p < 0,01$ означает достоверное отличие линии от сорта; # $p < 0,01$ — различие между эффектами холодового стресса (х.с.) и нормальных условий (н.у.)

Рисунок 47 – Содержание крахмала в корнях и листьях редактированных линий картофеля в сравнении с исходными сортами при нормальной (21°C) и низкой (4°C) температуре

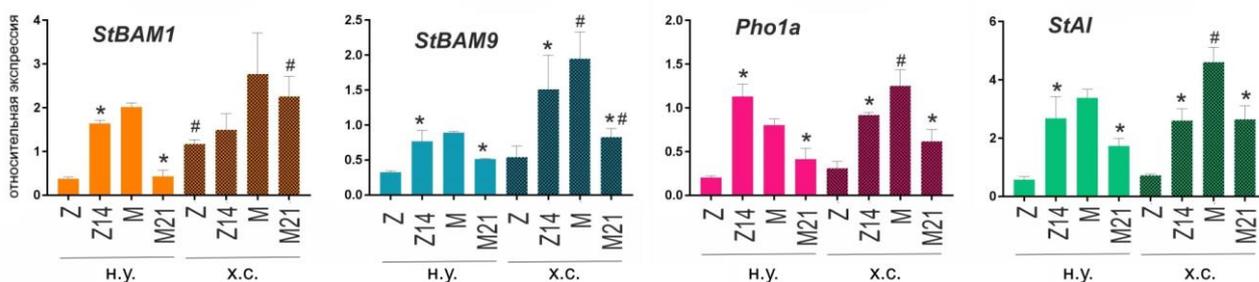
Те же ткани были использованы для анализа профиля экспрессии гена *PHO1a* и генов гидролиза крахмала – β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*). Выбор генов был основан на том, что экспрессия *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI* активируется в ответ на холод (Zhang et al., 2014a; Van Harselaar et al., 2017; Slugina et al., 2020b). Белок StBAM9, не имея амилазной активности, одновременно связывается с активной амилазой StBAM1 и поверхностью гранулы крахмала, вовлекая StBAM1 в процесс гидролиза (Zhang et al., 2014b; Hou et al., 2017). Каталитическую активность обеих амилаз способен ингибировать StAI (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b).

Было обнаружено, что в сравнении с сортами при нормальной температуре в листьях уровень транскриптов *PHO1a* понизился (T1, T3, Z14 и M21) или не изменился (L), а холодовой стресс негативно воздействовал на экспрессию гена и у сортов, и у линий (рис. 48). Последнее согласуется с похожими данными, полученными при исследовании растений риса (*O. sativa*) (Hwang et al., 2016). В корнях холодовой стресс не повлиял на экспрессию *PHO1a* относительно нормальных условий; при обеих температурах в сравнении с сортами уровень транскриптов гена повысился (Z14) или понизился (M21) (рис. 49).



Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 3$); референсные гены *ELF1* и *SEC3A*; линия отличается от контроля (* $p < 0,01$); различия 4°C vs 21°C (# $p < 0,01$)

Рисунок 48 – Экспрессия генов катаболизма крахмала в листьях редактированных линий и исходных сортов после холодового стресса (4°C, х.с.) и при нормальной (21°C, н.у.) температуре



Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 3$); референсные гены *ELF1* и *SEC3A*; линия отличается от контроля (* $p < 0,01$); различия 4°C vs 21°C (# $p < 0,01$)

Рисунок 49 – Экспрессия генов катаболизма крахмала в корнях исходных сортов и редактированных линий M21 и Z14 при нормальной (21°C, н.у.) и низкой (4°C, х.с.) температуре

В противоположность *PHO1a* воздействие низкой температуры оказалось стимулирующим (в сортах и линиях) для генов гидролиза крахмала, как в листьях (все три гена), так и в корнях (*StBAM1* и *StBAM9*) (рис. 48, 49). Кроме того, в отличие от листьев, в корнях профили экспрессии генов гидролиза крахмала и *PHO1a* характеризовались, в основном, сходной динамикой (рис. 49).

В целом, характер изменений профиля экспрессии генов *PHO1a*, *StBAM1*, *StBAM9* и *StAl* между сортами и линиями предположительно является следствием редактирования *PHO1a*. При этом отсутствие очевидных закономерностей может отражать индивидуальные особенности адаптации каждой из линий к изменениям в фосфоролитическом катаболизме крахмала.

Анализ возможной зависимости концентрации крахмала от экспрессии генов его катаболизма в листьях выявил некоторые связи. Для гена *PHO1a* была показана положительная корреляция ($R^2 = 0.6170$) для сортов, растущих в нормальных условиях (рис. 50). Для гена *StBAM9* была обнаружена положительная корреляция у линий M21 и Z14 ($R^2 = 0.8116$) и у сортов ($R^2 = 0.4081$) в ответ на холодовый стресс (рис. 50).

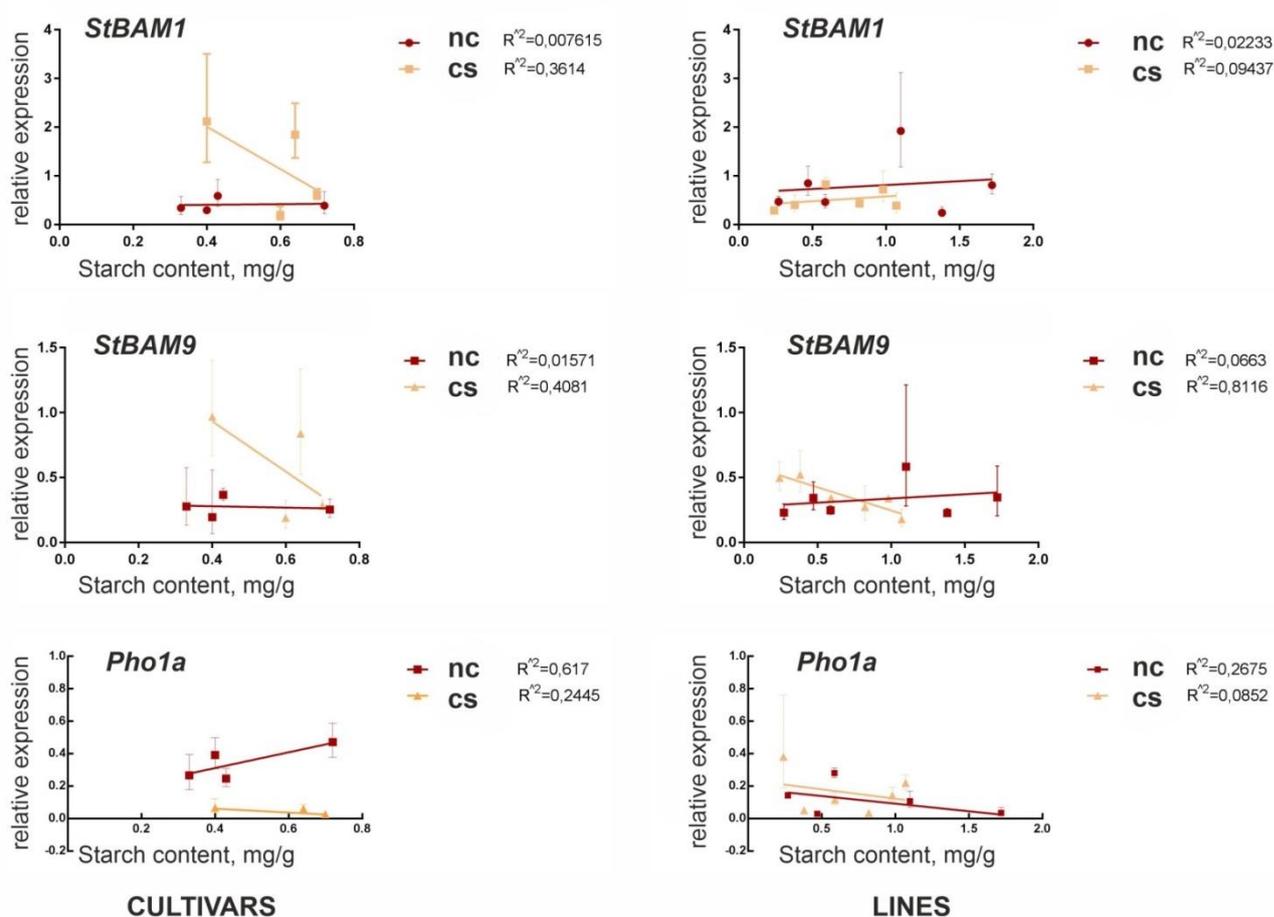
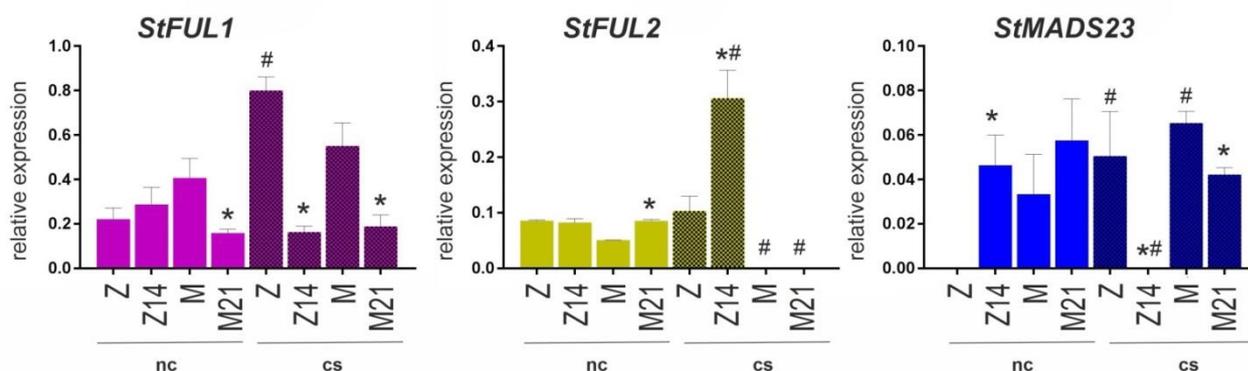


Рисунок 50 – Оценка корреляций между содержанием крахмала и экспрессией генов его катаболизма в листьях сортов и линий картофеля при нормальной (21°C, nc) и низкой (4°C, cs) температуре (достоверная корреляция при $R^2 > 0,4$)

С целью оценки участия MADS-ТФ картофеля в регуляции ответа на изменения в метаболизме крахмала, в корнях сортов (Мишка и Жуковский ранний) и линий (M21 и Z14) была определена экспрессия генов *StFUL1*, *StFUL2*, *StSOC1* и *StMADS23*. Эти гены были выбраны, так как их экспрессия индуцируется в корнях растений при стрессах, согласно (Parenicova et al., 2003; Gan et al., 2005; Gao et al., 2018; Alvarez-Buylla et al., 2019).

В результате было показано, что транскрипты *StSOC1* отсутствуют во всех анализируемых образцах. Гены *StFUL1*, *StFUL2* и *StMADS23* экспрессировались во всех образцах (за исключением *StMADS23* у сорта Жуковский ранний) (рис. 51). В нормальных условиях наибольший уровень экспрессии *StFUL1* был у сорта Мишка; в ответ на холод экспрессия гена росла у сортов, но не у линий. Ген *StFUL2* имел сходный уровень экспрессии во всех образцах в нормальных условиях, тогда как в ответ на холод его экспрессия не менялась (сорт Жуковский ранний) возрастала (Z14) или снижалась до следовых значений (сорт Мишка и

M21). Ген *StMADS23* активировался низкой температурой у сорта Жуковский ранний, и демонстрировал противоположный паттерн у Z14.



Данные представлены как среднее \pm SD ($n = 3$); референсные гены *ELF1* и *SEC3A*; линия отличается от контроля (* $p < 0,01$); различия 4°C vs 21°C (# $p < 0,01$)

Рисунок 51 – Профиль экспрессии *MADS-box* генов в корнях сортов и линий картофеля при нормальной (21°C, nc) и низкой (4°C, cs) температуре

Как уже говорилось, регуляция углеводного метаболизма и стрессовой реакции растений осуществляется, в том числе, за счет *MADS*-доменных ТФ (Zha et al., 2019; Song et al., 2021). Этому соответствует показанная нами дифференциальная экспрессия *MADS-box* генов в корнях редактированных линий (vs исходный сорт). Два их них – *StFUL1* и *StFUL2* являются гомологами гена *A. thaliana AGL79*, известного своей ролью в развитии латеральной корневой системы и реакции на недостаток микроэлементов в почве (Gan et al., 2005; Gao et al., 2018). У картофеля *StFUL1* (*POTM1*) участвует в регуляции развития пазушных почек побега (Rosin et al., 2003). Третий ген – *StMADS23*, является гомологом гена *A. thaliana ANR1*, который влияет на рост корней и на нехватку азота в почве (Gan et al., 2005; Alvarez-Buylla et al., 2019). Все эти данные согласуются с измененным фенотипом корней и побегов у полученных нами редактированных линий (рис. 46) и показанной дифференциальной экспрессией генов *StMADS23*, *StFUL1* и *StFUL2* в корнях этих линий, включая в ответ на холод (рис. 51).

Таким образом, наши результаты могут подтверждать роль *MADS-box* генов подсемейств *SEPALLATA* и *FRUITFULL* в регуляции метаболизма крахмала, в том числе в ответ на холодовой стресс (Nezhdanova et al., 2022).

3.3.2. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях табака *N. tabacum* с измененным метаболизмом крахмала за счет неполного нокаута гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1*

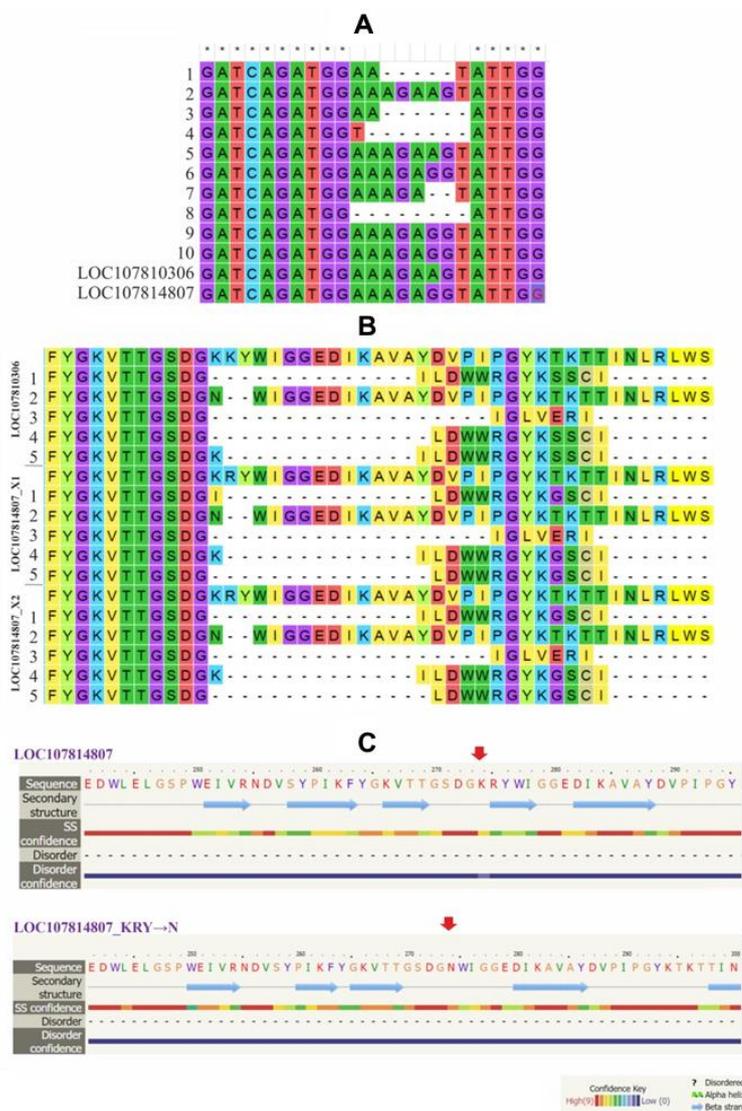
Нам не удалось нокаутировать ген *PHO1a* в растениях картофеля. Поэтому в следующей части исследования нами была предпринята успешная попытка редактирования (CRISPR-Cas9) гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* в геноме табака.

Проведенный нами анализ геномных данных показал, что геном табака содержит два паралогичных гена *NtPHO1-L1* (LOC107810306 и LOC107814807), которые гомологичны гену *PHO1a S. tuberosum*. Гены различаются размером (9490 и 9533 пн), последовательностью (несинонимичными SNPs, индели), структурой (15 и 16 экзонов), локализацией в скаффолдах и количеством изоформ транскриптов (1 и 2; кодируемые белки различаются размером). Изоформы: ген LOC107810306 – мРНК XM_016635072.1; LOC107814807 – мРНК X1 (XM_016640265.1) и X2 (XM_016640266.1). При сравнении всех трех изоформ мРНК оказалось, что gRNA, использованная нами для редактирования *PHO1a* у картофеля, подходит и для *NtPHO1-L1*. Локализация gRNA в кДНК *NtPHO1-L1*: 1109–1131 н (XM_016635072.1; экзон XI) и 1141–1163/1039–1061 н (XM_016640265.1/ XM_016640266.1; экзоны VI/V).

С помощью агробактериальной трансформации (использован бинарный вектор p201N-*PHO1a*-gRNA из работы по картофелю) было получено 12 независимых регенерантов T₀, содержащих в геноме кассету для редактирования. Внешне данные растения ничем не отличались от контроля.

С использованием геномной ДНК регенерантов был амплифицирован, клонирован и секвенирован (10 клонов) целевой сайт редактирования. В случае отобранной для дальнейшего анализа линии Nt1 было показано, что половина из 10 клонок содержали варианты делеций: (1) a13–g17→del(5nt)#; (2) a13–t18→del(6nt)#; (3) a11–g17→del(7nt)#; (4) a/g16–g17→del(2nt)#; (5) a11–t18→del(8nt)# (локализация указана по последовательности gRNA) (рис. 52А).

При трансляции варианты 1, 3, 4 и 5 сдвигают рамки считывания с образованием преждевременных стоп-кодонов и укороченных (в ~3 раза) белков. Вариант 2 (делеция 6 н) приводит к радикальному замещению KRY→N (рис. 52В).



A – сравнение целевого участка *NtPHO1-L1* линии Nt1 (клоны 1–10) с LOC107810306 и LOC107814807.

B – сравнение вариантов редактированного участка белка NtPHO1-L1 с LOC107810306 и LOC107814807. C – Сравнение вторичной структуры редактированного участка белка NtPHO1-L1 с LOC107810306 и LOC107814807 (Phyre2). Локализация замещения KRY→N (KKY→N для LOC107810306) указана стрелкой

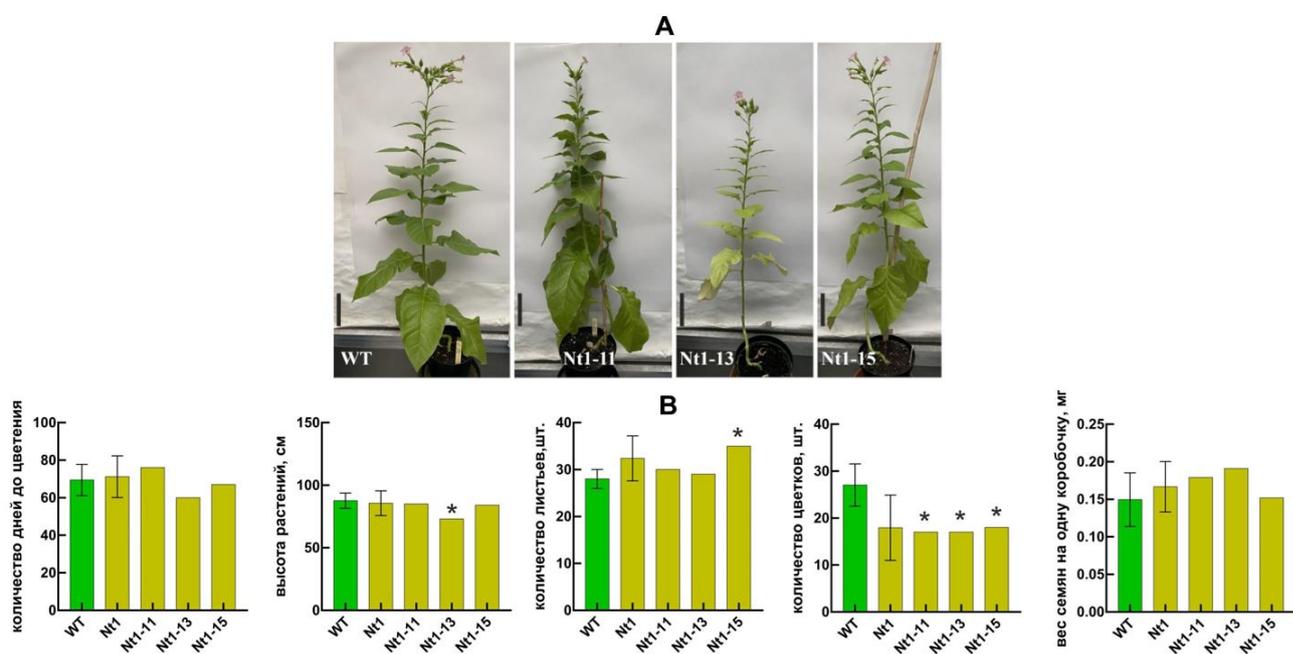
Рисунок 52 – Анализ последовательности *NtPHO1-L1* у трансгенных линий табака в сравнении с контролем

Варианты редактированного белка 1, 3, 4 и 5 не содержат L78, которая разделяет N- и C-концевые участки функционального домена GT35_Glycogen_Phosphorylase (cd04300) NtPHO1-L1 и в которую входит каталитический центр. Вариант 2 соответствует полноразмерному белку с радикальным замещением в N-концевом участке домена (рис. 52B), не затрагивающим известные каталитические и белок-связывающие сайты. Данное замещение может (согласно Phyre2) привести к утрате одного из параллельных β -листов, которые образуют укладку

Россмана (Rossmann fold), характерную для N-концевой части домена GT35. Это может повлиять на фолдинг и, как следствие, на функцию белка варианта 2.

Таким образом, редактированная линия Nt1 может характеризоваться присутствием крахмалфосфорилаз дикого типа и их нефункциональных белковых форм.

Из 20 потомков T₁ от линии Nt1 были отобраны три растения (Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15), в геноме которых присутствовали все пять вариантов редактированного аллеля *NtPHO1-L1* наряду с аллелем дикого типа. При сравнении линий с контролем была обнаружена заметная разница в степени окраски листьев (Nt1-13, Nt1-15), а также в высоте (Nt1-13) и количестве листьев (Nt1-15) и цветков (Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15) (рис. 53).



А – Редактированные линии и контроль на стадии антезиса (масштаб = 10 см). В – Морфологические характеристики линий и контроля, представленные как среднее значение по 20 растениям (Nt1 и WT, соответственно) и значения для каждой из линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15. * $p < 0.05$ – означает достоверность отличия T₁ Nt1 от WT

Рисунок 53 – Редактированные линии Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с контролем WT

Учитывая ослабление окраски листа у линий Nt1-13 и Nt1-15, было определено содержание каротиноидов (сумма) и хлорофиллов (*a* и *b*), а также связанных с работой *NtPHO1-L1* углеводов (крахмала, сахарозы, фруктозы, глюкозы) в листьях Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15 и контроля. Было обнаружено, что содержание пигментов не изменилось (Nt1-11) или значительно уменьшилось (Nt1-13, Nt1-15) (рис. 54). У всех трех линий наблюдался рост количества крахмала (в ~10, 37 и 12 раз, соответственно) и фруктозы (в ~8, 2 и 2 раза, соответственно); у Nt1-15 уменьшилась концентрация сахарозы, а у Nt1-11 – глюкозы () (рис.

54. Мы предположили, что различия между химерными по факту редактирования линиями Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 связаны с разной степенью произошедшего редактирования.

Таким образом, даже частичное нокаутирование гена *NtPHO1-L1* стимулирует накопление транзиторного крахмала в фотосинтезирующей ткани, что может быть результатом усиления синтеза или ослабления деградации крахмала. Наши данные не соответствуют ранее показанному на примере картофеля сохранению количества крахмальных гранул в хлоропластах листьев при нокауте *PHO1a* (Sharma et al., 2023). Такая противоречивость данных может быть связана с тем, что в работе (Sharma et al., 2023) был получен полный нокаут гена, тогда как в нашем случае – только частичный.

Содержание транзиторного крахмала в листьях взаимосвязано со скоростью фотосинтеза, а, следовательно, с количеством хлорофиллов и каротиноидов (AbdElgawad et al., 2020). Наши данные по линиям Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 свидетельствуют об отсутствии корреляций между количеством крахмала и пигментов (рис. 54), что может быть объяснено неполным нокаутом гена *NtPHO1-L1* и существованием более сложных зависимостей между содержанием крахмала и пигментов фотосинтезирующего аппарата.

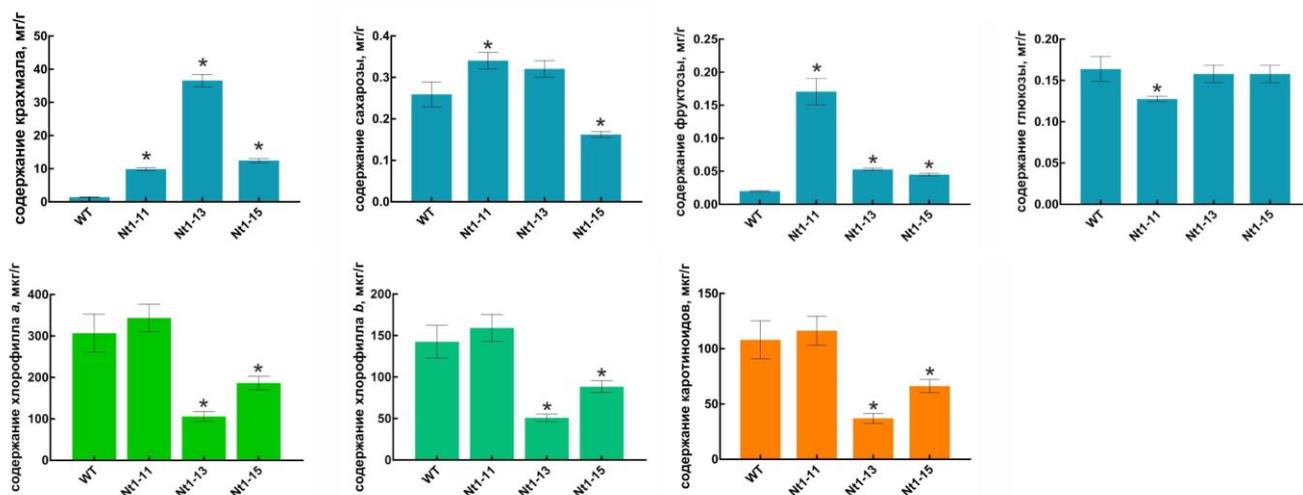


Рисунок 54 – Концентрация пигментов (мкг/г свежей массы) и углеводов (мг/г свежей массы) в листьях контроля (WT) и отредактированных растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 (* $p < 0.05$ – T_1 Nt1 vs WT)

В листьях Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 (*vs* WT) была определена экспрессия *NtPHO1-L1*. Было показано, что уровень транскриптов гена повысился (Nt1-11), снизился (Nt1-15) или не изменился (Nt1-13) (рис. 55). Анализ экспрессии генов α -глюкан водной дикиназы *NtGWD*, β -амилаз *NtBAM1* и *NtBAM9* и ингибитора амилаз *NtAI*, связанных с деградацией крахмала, также выявил некоторые отличия от контроля: снизился уровень транскриптов *NtGWD* (Nt1-13, Nt1-15), *NtBAM1* (все три линии), *NtBAM9* (Nt1-11) и *NtAI* (Nt1-15); повысился уровень транскриптов *NtBAM9* (Nt1-15) и *NtAI* (Nt1-11, Nt1-13) (рис. 55).

Полученные данные могут быть интерпретированы как попытка редактированных растений приспособиться к частичному нокауту. В то время как экспрессия *NtBAM1* изменялась сходным между линиями образом, с учетом остальных генов схема адаптации специфична для каждого конкретного растения и применяет комбинирование разных уровней экспрессии *NtGWD*, *NtBAM9* и *NtAI*.

Мы предполагаем, что у всех трех линий накопление крахмала (рис. 54) произошло за счет замедления его гидролиза и, возможно, усиления синтеза. При этом линии Nt1-11 и Nt1-15 более приближены к контролю, то есть более успешно, чем Nt1-13, противостоят частичному нокауту *NtPHO1-L1*. Если судить по окраске листьев, содержанию пигментов и морфологическим характеристикам, то линия Nt1-11 адаптировалась лучше, чем Nt1-15.

Учитывая изменения в листовом содержании пигментов, была определена экспрессия ключевых генов биосинтеза каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtCRTISO*, *NtZDS*, *NtVDE*). С работы фитоинсинтазы PSY2 начинается синтез каротиноидов в фотосинтезирующей ткани. Ферменты PDS (фитоиндесатураза), ZDS (15-цис- ζ -каротинизомераза) и CRTISO (цис-транс-каротиноидизомераза) участвуют в последующем преобразовании 15-цис-фитоина в транс-ликопин. В виолаксантиновом цикле VDE (виолаксантиндеэпоксидаза) участвует в перераспределении энергии света между виолаксантином, зеаксантином (ксантофиллы) и хлорофиллом *a* (Rosas-Saavedra and Stange, 2016).

Обнаруженные отличия линий от контроля включали: снижение уровня транскриптов *NtPSY2* (Nt1-15), *NtPDS* (Nt1-11, Nt1-13), *NtCRTISO* (Nt1-11), *NtZDS* (Nt1-11, Nt1-13) и *NtVDE* (Nt1-11); усиление экспрессии *NtPDS* (Nt1-15), *NtCRTISO* (Nt1-15), *NtZDS* (Nt1-15) и *NtVDE* (Nt1-15) (рис. 55).

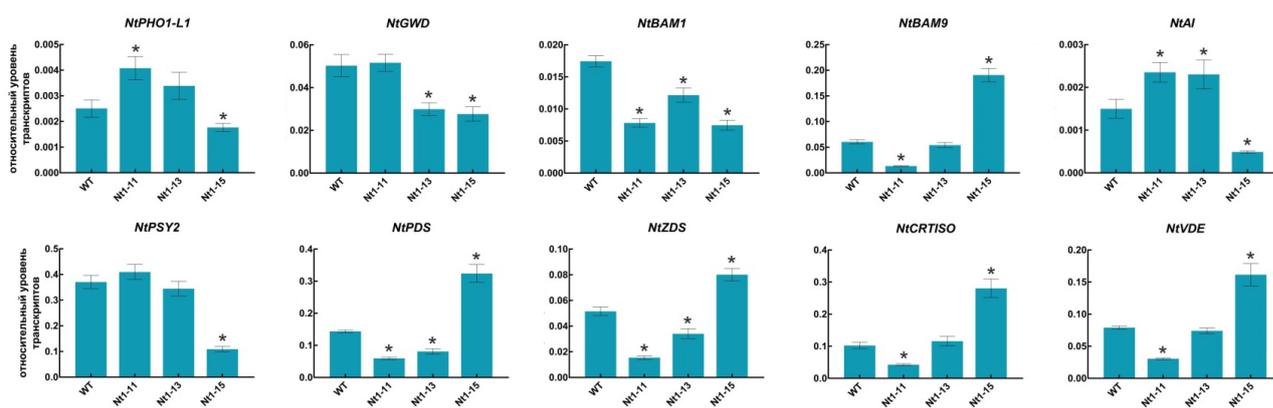


Рисунок 55 – Профиль экспрессии генов, связанных с деградацией крахмала (*NtPHO1-L1*, *NtGWD*, *NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtAI*) и биосинтезом каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtCRTISO*, *NtZDS*, *NtVDE*) в листьях Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с контролем WT (* $p < 0.05$ – T₁ Nt1 vs WT)

Поскольку известно участие MADS-доменных ТФ в регуляции множества генов метаболических путей (раздел 1.5.1), мы предположили, что MADS-ТФ подсемейств SEP и FUL могут участвовать в регуляции транскрипции генов метаболизма крахмала и каротиноидов.

Действительно, анализ промоторов генов гидролиза крахмала и биосинтеза каротиноидов обнаружил сайты связывания с MADS-ТФ у большинства анализируемых нами генов (табл. 19 в Приложении).

Мы провели анализ экспрессии *MADS-box* генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtFUL1* в листьях редактированных растений (*vs* WT). Транскрипты *NtSEP3* были обнаружены только у Nt1-11 и Nt1-15, тогда как остальные гены экспрессировались у всех образцов. Уровень транскриптов *NtFUL1* снизился у Nt1-15, *NtSEP1* – поднялся (Nt1-11) или уменьшился (Nt1-15), а *NtSEP2* – снизился (Nt1-11, Nt1-15) (рис. 56).

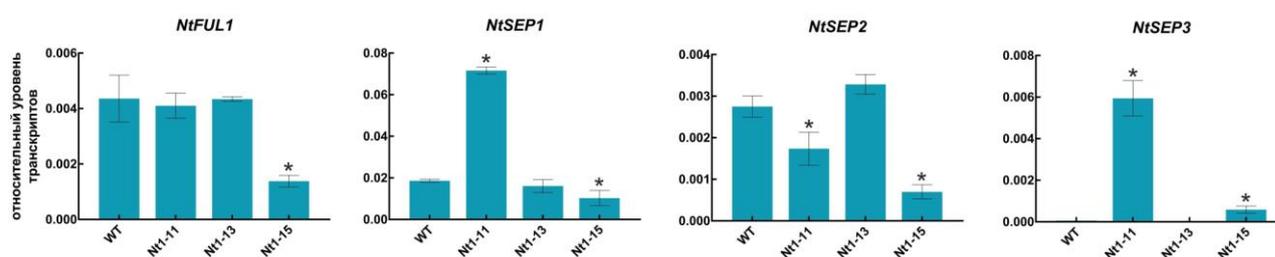


Рисунок 56 – Экспрессия *MADS-box* генов *NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtSEP3* в листьях линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с контролем WT (* $p < 0,05$ – достоверность отличия T₁ от Nt1 от WT)

В целом, у линии Nt1-13 с наибольшим снижением содержания хлорофиллов/каротиноидов и наибольшим повышением содержания крахмала уровень транскриптов всех проанализированных *MADS-box* генов был сопоставим с контролем (рис. 56). Каждая из линий Nt1-11 и Nt1-15, где количество крахмала выросло слабее (*vs* Nt1-13), а количество пигментов мало изменилось (*vs* Nt1-11 и Nt1-15), характеризовалась специфичным профилем экспрессии *MADS-box* генов (рис. 56).

Таким образом, изменение метаболизма транзитного крахмала за счет частичного нокаута гена *NtPHO1-L1* затронуло накопление углеводов и пигментов (каротиноиды, хлорофиллы), а также экспрессию генов соответствующих путей. Мы показали, что, как и ожидалось, адаптационный ответ таких растений включает изменение профиля экспрессии *MADS-box* генов подсемейств *SEP* и *FUL* как предположительных регуляторов генов метаболизма углеводов и каротиноидов, в том числе в ответ на стресс (Nezhdanova et al., 2024).

3.3.3. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях табака *N. tabacum* с измененным метаболизмом каротиноидов за счет неполного нокаута гена фитоиндесатуразы *NtPDS*

Кроме генов метаболизма крахмала, известными мишенями *MADS-box* ТФ является большинство генов метаболизма каротиноидов, которые тоже ассоциированы с приспособлением растений к любым стрессовым условиям. В растениях каротиноиды – это, прежде всего метаболиты, незаменимые для осуществления фотосинтеза и фотозащиты (Brausemann et al., 2017). Отсутствие данных пигментов полностью нарушает фотосинтез, а также наработку провитамина А и фитогормонов (стриголактонов и абсцизовой кислоты (АБК)) (Babu et al., 2013; Chen et al., 2020; Mashiguchi et al., 2021). Одна из первых стадий синтеза каротиноидов заключается в преобразовании 15-*цис*-фитоина (предшественник всех каротиноидов) под действием фитоиндесатуразы PDS (Wagner et al., 2002), подавление которой приводит к отсутствию каротиноидов и гибели растения (Brausemann et al., 2017). Снижение экспрессии гена *PDS* снижает стрессоустойчивость растения (DeBlasio et al., 2018) и количество каротиноидов (Naing et al., 2019). В плодах томата транскрипция гена *PDS* находится под положительным контролем *MADS*-ТФ RIN (Dong et al., 2014; Naing et al., 2019), что мишенями которого являются почти все гены пути биосинтеза каротиноидов (Fujisawa et al., 2013; Li et al., 2018).

С помощью технологии CRISPR-Cas9 нами были получены линии табака с частично нокаутированным геном *PDS*. Была выбрана последовательность гРНК (5'-gagattgtattgctggtgcagg-3'; конец экзона II) и собрана конструкция p201N-*NtPDS*-gRNA, которая была использована для получения трансгенного табака с помощью агробактериальной трансформации. Трансгенные регенеранты были химерны по факту редактирования. Поэтому от контроля регенеранты T₀ *NtPDS*-gRNA отличались разной степенью изменения окраски листьев: белой (тип 1), зеленой (тип 2) и мозаичной бело-зеленой (тип 3) (рис. 57). Регенеранты типа 1 погибали, что соответствует наибольшему охвату клеток растения по нокауту гена, а также данным других исследований, связанных с выключением гена *PDS* (Xu et al., 2018) или нефункциональностью белка PDS (Chen et al., 2018; Bánfalvi et al., 2020).

Группа жизнеспособных регенерантов состояла из 27 растений типов 2 (18 линий) и 3 (9 линий). Растения обоих типов (2 и 3) имели некоторые морфологические отличия от контроля, включая время цветения (рис. 58).



Рисунок 57 – Примеры регенерантов табака с различной окраской листьев (B, C, E) в сравнении с контролем (A, D)

Паттерн пигментации листьев типа 3 наглядно свидетельствовал о мозаичности нокаута гена в различных клетках растения. Подобный эффект неполного редактирования наблюдается довольно часто при сочетании CRISPR/Cas9 с агробактериальной трансформацией растения (Cui et al., 2021). В нашем случае это оказалось полезным, поскольку именно неполное редактирование позволило выжить регенерантам типов 2 и 3. При этом гибель регенерантов типа 1 подтверждает значимость PDS для растения.

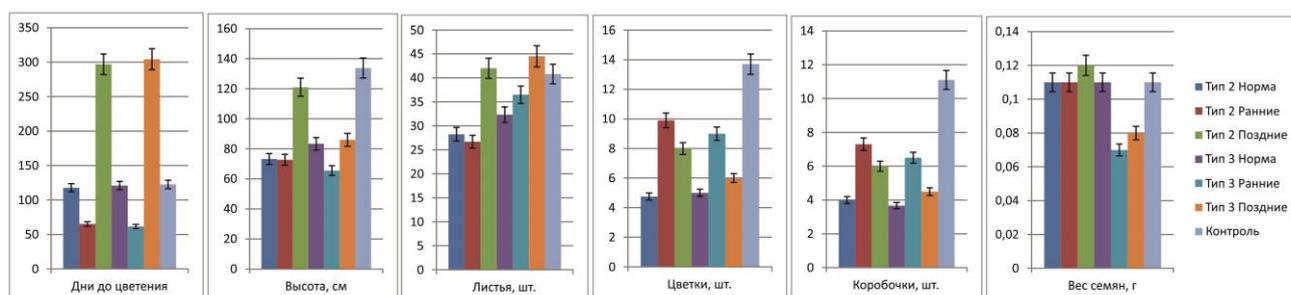


Рисунок 58 – Сравнение характеристик полученных регенерантов табака с контролем

Мы клонировали и секвенировали целевую последовательность (gRNA) у всех полученных нами регенерантов всех типов (1–3). В случае растения типа 1 была обнаружена инсерция 350^351→ins^g# в 9 из 10 секвенированных клонов. У регенерантов типа 2 были обнаружены SNPs 341t→c (приводит к нейтральному замещению V114→A) и 351t→c (синонимичная замена), не приводящие к сбою рамки считывания в гене *PDS*. Для растений типа 3 было характерно присутствие тех же SNPs, а также инделей t351→del(1nt)#, 350^351→ins^g#, 350^351→ins^t# (рис. 59).

Все индели приводили к сбою рамки считывания и синтезу укороченного белка – 154 или 144 ао (vs 582 ао в норме), что исключает образование функционального гомотетрамера PDS, так как стабилизация димеров PDS в тетрамере происходит благодаря взаимодействию аминокислотных остатков, расположенных после 200 ао (Brausemann et al., 2017).

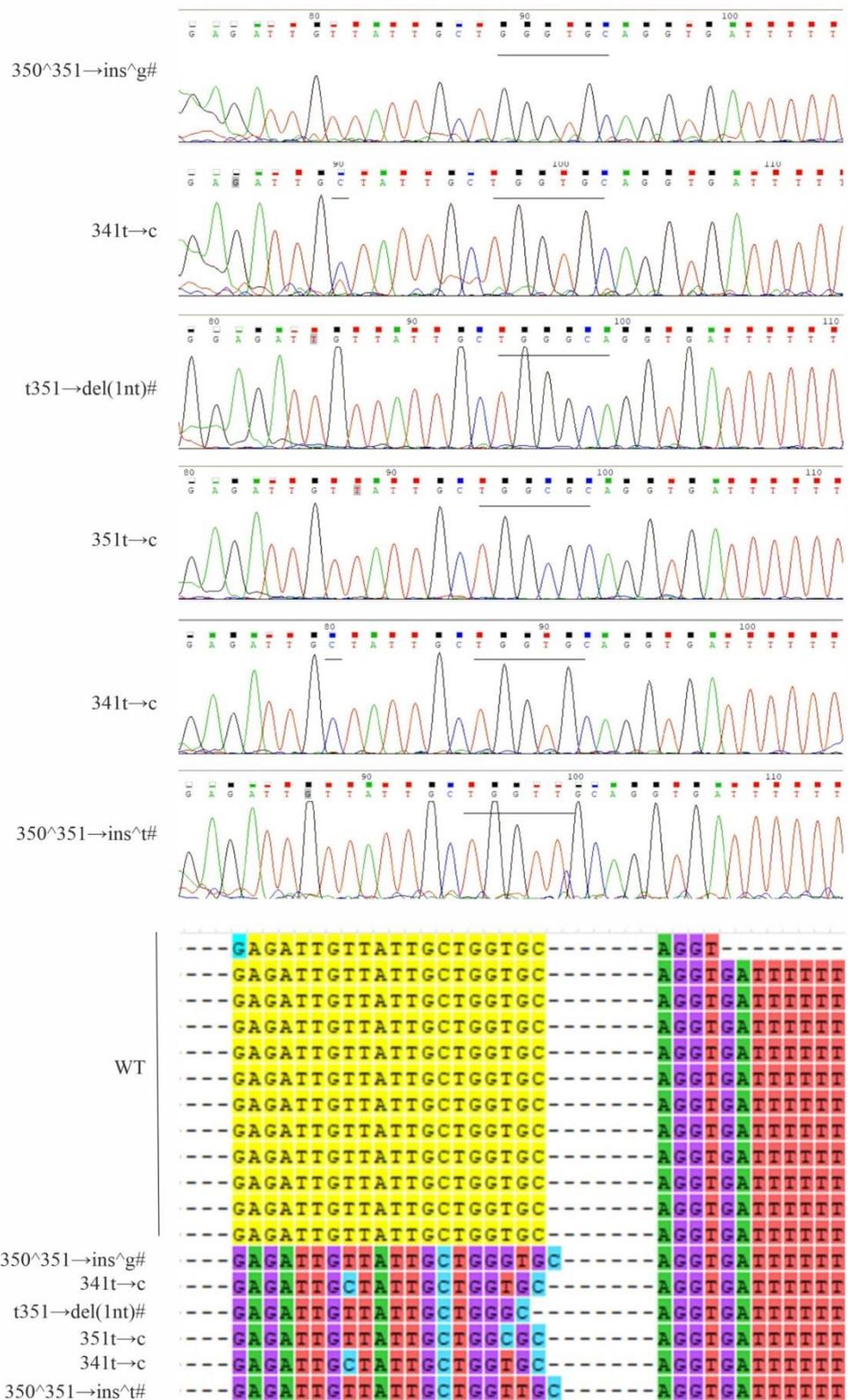


Рисунок 59 – SNPs и индели, обнаруженные при секвенировании последовательности gRNA *NtPDS* в геноме регенерантов табака

Из группы регенерантов типа 3 для дальнейшего анализа были выбраны две наиболее поздно цветущие линии L28 и L29 (346 (L28) и 461 (L29) день *vs* норма 122 дня (WT)). Было обнаружено, что листья данных растений содержат существенно (в ~1.5 раза *vs* контроль)

меньше хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов; при этом концентрация антоцианов равна контрольной (рис. 60).

Таким образом, мозаичная окраска листа соответствовала данным биохимического анализа. Присутствие инделей в последовательности гена *PDS* у L28 и L29 повлияло на количество хлорофиллов и каротиноидов, поскольку нефункциональные варианты фермента приводили к остановке синтеза каротиноидов и накопления ксантофиллов (незаменимых участников фотосинтеза) (Brausemann et al., 2017). Отсутствие последних у части клеток могло нарушить функцию хлоропластов и привести к уменьшению количества хлорофиллов (Zhang et al., 2010). Также в редактированных клетках могут отсутствовать такие продукты катаболизма ксантофиллов, как АБК и стриголактоны, необходимые для онтогенеза растения (Chen et al., 2020; Mashiguchi et al., 2021); снижение их количества (эффект мозаичности редактирования) могло стать причиной морфологических изменений у редактированных линий, включая сроки цветения.

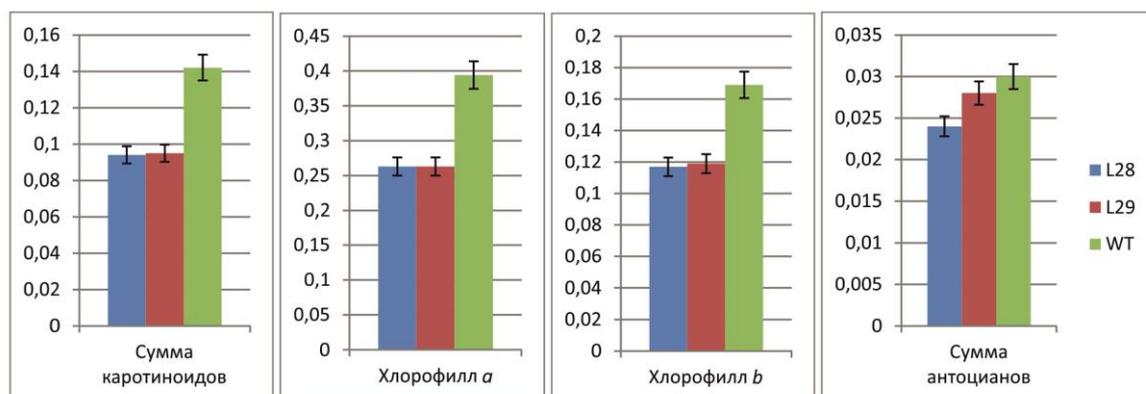


Рисунок 60 – Концентрация (мг/г сырого веса) пигментов (хлорофилл *a* и *b*, сумма каротиноидов, сумма антоцианов) в листьях линий L28 и L29 в сравнении с контролем

Далее, в листьях линий L28 и L29 (*vs* WT) был определен уровень полноразмерных транскриптов гена *NtPDS* и экспрессия других генов каротиногенеза (*NtPSY2*, *NtCrtISO*, *NtZDS*, *NtLCYB*, *NtCrtRB1*, *NtVDE*). Было выявлено, что уровень транскриптов *NtPDS* снизился (L28) или повысился (L29), *NtCrtRB1* не изменился (L28, L29), *NtPSY2* повысился (L28, L29), а уровень всех остальных генов увеличился (L29) или не изменился (L28) (рис. 61). Какой-либо зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов каротиногенеза найдено не было, вероятно, из-за мозаичности редактирования.

Совокупность данных экспрессионного и биохимического анализов предполагает, что позднее цветение растений L28 и L29 может быть следствием мозаичных нарушений фотосинтеза (снижено количество ксантофиллов за счет их отсутствия в клетках с нокаутом гена) и процессов онтогенеза (снижено количество АБК и стриголактонов как производных ксантофиллов).

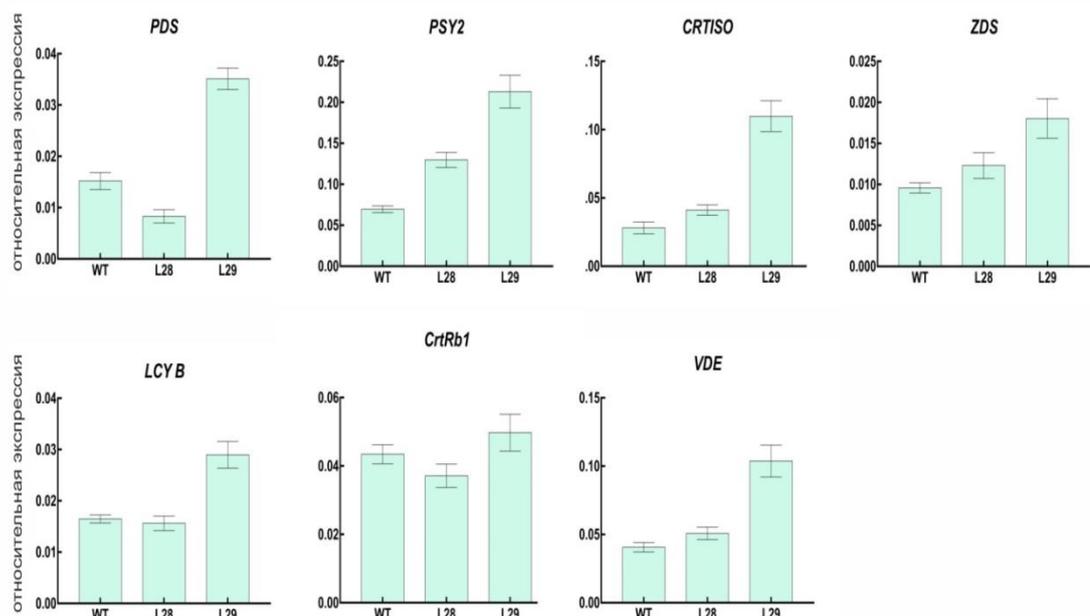


Рисунок 61 – Экспрессия генов биосинтеза каротиноидов в листьях L28 и L29 vs WT (* $p < 0,01$)

Как мы уже говорили, экспрессия генов каротиногенеза может регулироваться MADS-доменными ТФ (Fujisawa et al., 2013; Li et al., 2018), например, ТФ RIN (подсемейство SEP) (Naing et al., 2019; Slugina, 2021). С учетом этого, для дальнейшего анализа были выбраны гены табака подсемейства SEP (*NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*). Кроме того, в анализ были взяты гены *NtFUL1* и *NtANR1*, поскольку гомологичные им гены активируются в вегетативной ткани в ответ на стрессовые факторы (Castelán-Muñoz et al., 2019; Zhang et al., 2023).

Мы провели анализ экспрессии выбранных генов в тех же листовых тканях L28 и L29 (vs WT) и обнаружили экспрессию *NtSEP1* и *NtFUL1*, но не *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtANR1*. При этом значительное отличие между линиями и контролем наблюдались только для гена *NtSEP1* (рис. 62). Данный факт предполагает, что ТФ *NtSEP1* может участвовать в регуляции транскрипции генов каротиногенеза в листьях табака. Кроме того, это может быть подтверждением участия MADS-доменных ТФ подсемейства SEP в АБК-сигнальных путях защитной реакции растений (Castelán-Muñoz et al., 2019; Li et al., 2021; Zhao et al., 2021, Нежданова и др., 2023).

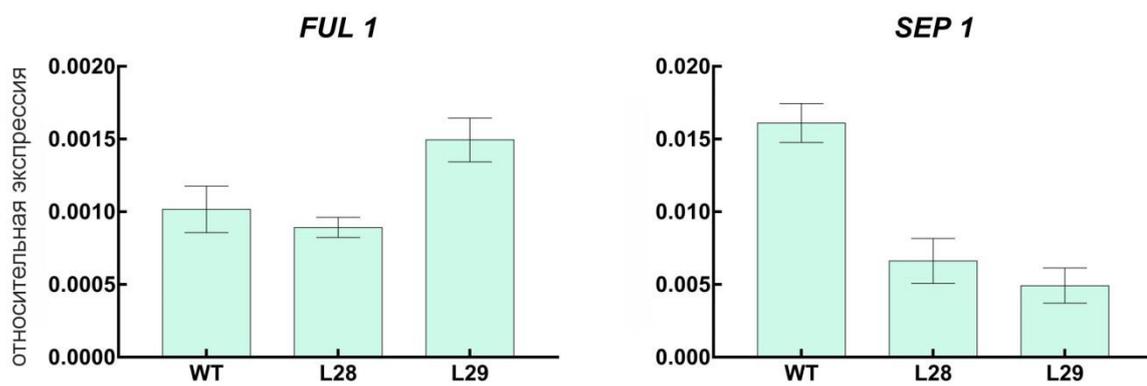


Рисунок 62 – Экспрессия генов *NtSEP1* и *NtFUL1* в листьях L28 и L29 vs WT (* $p < 0,01$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационном исследовании была проведена структурно-филогенетическая характеристика семейств генов *YABBY*-доменных и *MADS*-доменных (МИКС^с) ТФ у видов растений сем *Solanaceae* (томат, табак, др.), *Asteraceae* (хризантема, подсолнечник) и *Ericaceae* (подъельник). Функционально охарактеризованы отдельные гены *YABBY* и *MADS-box*, которые предположительно выполняют наиболее важные роли в развитии растения, а именно, гены *YABBY*, представляющие подсемейство *FIL* как наиболее многочисленное и древнее, а также *MADS-box* гены, ассоциированные с выполнением генетических активностей В, С и Е. С этой целью получены и охарактеризованы трансгенные растения табака со сверхэкспрессией (индивидуальной или комбинаторной) данных генов.

На основании полученных результатов сделан вывод о том, что гены подсемейства *FIL* подъельника (*MhyFIL1*, *MhyFIL3*) и хризантемы (*CDM51*) участвуют в определении асимметричного развития листа и, в случае подъельника, сохранили свои функции, несмотря на отсутствие у данного вида листьев. Наблюдаемые изменения фенотипа растений со сверхэкспрессией генов *MADS-box* подтвердили, что гены *CDM44* и *SIMADS5* (Е-активность) играют роль в закладке лепестков и репродуктивных органов, *CDM37*, *HAM45* и *HAM59* (С-активность) – пестика и семязачатков, а *CDM86* и *CDM115* (В-активность) – лепестков и тычинок. Полученные нами данные свидетельствуют о высокой консервативности генетических механизмов контроля процессов развития у видов растений.

Проведен анализ возможного участия *MADS-box* генов в регуляции адаптивной реакции растения при воздействии абиотических стрессовых факторов (холод, нарушение углеводного обмена или биосинтеза каротиноидов). Показано, что растения со сверхэкспрессией гена *CDM44* обладают повышенной холодостойкостью при обработке пониженными температурами в процессе роста. Получены трансгенные растения табака и картофеля с нарушенным метаболизмом крахмала или каротиноидов за счет редактирования (нокаут или мутация) генов соответствующих путей (в случае крахмала – ген крахмалфосфорилазы *PHO1a/NtPHO-L1*; в случае каротиноидов – ген фитоиндесатуразы *PDS*). Показано, что введенные метаболические нарушения сопровождаются дифференциальной экспрессией *MADS-box* генов подсемейств *SEP* и *FUL*, что говорит о возможной роли этих генов в регуляции сигнальных путей стрессового ответа растения.

Фундаментальная значимость результатов связана с научным вкладом в исследования механизмов регуляции морфогенеза растений. Практическая ценность заключается в том, что функции исследуемых *MADS-box* и *YABBY* генов ассоциированы с различными хозяйственно-ценными признаками сельскохозяйственных культур, такими как сроки цветения и созревания,

урожайность, характеристики плодов и семян, стрессоустойчивость, разнообразие фенотипов цветка декоративных видов (*MADS-box*), а также морфологией вегетативной надземной части растения, формой плода, количеством семян (*YABBY*). Поэтому данные об аллельной вариабельности и/или дифференциальной экспрессии *YABBY* и *MADS-box* генов между сортами и линиями одной культуры могут быть использованы для поиска перспективных источников целевых признаков в селекции новых улучшенных сортов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что *YABBY*-гены *MhyFIL1*, *MhyFIL3* (подъельник) и *CDM51* (хризантема) кодируют ортологи ТФ подсемейства FILAMENTOUS FLOWER и могут определять асимметричное развитие листьев и апикальной меристемы побега подъельника и хризантемы.
2. Показано, что гены подъельника *MhyFIL1* и *MhyFIL3* сохранили свою функцию, несмотря на отсутствие листьев у вида *Monotropa hypopitys*.
3. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM44* (хризантема) и *SIMADS5* (томат) кодируют ортологи ТФ подсемейства SEPALLATA3 и могут определять идентичность лепестков, тычинок и пестика цветка у хризантемы и томата (Е-активность), а также регулировать созревание плода (*CDM44*) и биосинтез каротиноидов/антоцианов (*SIMADS5*).
4. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM37* (хризантема), *HAM45* и *HAM59* (подсолнечник) кодируют ортологи ТФ подсемейства AGAMOUS и могут участвовать в дифференцировке цветковой меристемы, тычинок и пестика у хризантемы и подсолнечника (С-активность).
5. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM86* и *CDM115* хризантемы кодируют ортологи ТФ подсемейств PISTILLATA и APETALA3, соответственно, и могут в составе гетеродимера определять идентичность лепестков и тычинок цветка у хризантемы (В-активность).
6. Показано, что сверхэкспрессия *MADS-box* гена *CDM44* (хризантема) приводит к повышенной холодостойкости трансгенных растений табака.
7. Показано, что *MADS-box* гены подсемейств SEPALLATA и FRUITFULL могут участвовать в регуляции стрессового ответа растений, в том числе посредством регуляции экспрессии генов метаболизма крахмала и каротиноидов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. AbdElgawad H., Avramova V., Baggerman G., et al. Starch biosynthesis contributes to the maintenance of photosynthesis and leaf growth under drought stress in maize // *Plant, Cell & Environment*. – 2020. – Т. 43. – №. 9. – С. 2254-2271.
2. Allard A., Bink M. C., Martinez S., Detecting QTLs and putative candidate genes involved in budbreak and flowering time in an apple multiparental population // *Journal of experimental botany*. – 2016. – Т. 67. – №. 9. – С. 2875-2888.
3. Alvarez-Buylla E.R., García-Ponce B., Sánchez M.P., et al. MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms // *New Phytologist*. – 2019. – Т. 223. – №. 3. – С. 1143-1158.
4. Amasino R. M., Michaels S. D. The timing of flowering // *Plant Physiology*. – 2010. – Т. 154. – №. 2. – С. 516-520.
5. Arora R., Agarwal P., Ray S., et al. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress // *BMC genomics*. – 2007. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-21.
6. Babu R., Rojas N.P., Gao S., et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2013. – Т. 126. – С. 389-399.
7. Bai Y., Lindhout P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? // *Annals of botany*. – 2007. – Т. 100. – №. 5. – С. 1085-1094.
8. Bailey-Serres J., Parker J. E., Ainsworth E. A., et al. Genetic strategies for improving crop yields // *Nature*. – 2019. – Т. 575. – №. 7781. – С. 109-118.
9. Bánfalvi Z., Csákvári E., Villányi V., Kondrák M. Generation of transgene-free PDS mutants in potato by *Agrobacterium*-mediated transformation // *BMC biotechnology*. – 2020. – Т. 20. – №. 25 – С. 1-10.
10. Barah P., Jayavelu N., Rasmussen S., et al. Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes // *BMC genomics*. – 2013. – Т. 14. – №. 1. – С. 1-16.
11. Bartholmes C., Hidalgo O., Gleissberg S. Evolution of the YABBY gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) // *Plant Biology*. – 2012. – Т. 14. – №. 1. – С. 11-23.
12. Bechtold U., Penfold C. A., Jenkins D. J., et al. Time-series transcriptomics reveals that *AGAMOUS-LIKE22* affects primary metabolism and developmental processes in drought-stressed *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. – 2016. – Т. 28. – №. 2. – С. 345-366.

13. Beerling D. J., Fleming A. J. Zimmermann's telome theory of megaphyll leaf evolution: a molecular and cellular critique // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2007. – T. 10. – №. 1. – C. 4-12.
14. Beletsky A. V., Filyushin M.A., Gruzdev E.V., et al. De novo transcriptome assembly of the mycoheterotrophic plant *Monotropa hypopitys* // *Genomics data*. – 2017. – T. 11. – C. 60-61.
15. Bemer M., Heijmans K., Airoidi C., et al. An atlas of type I MADS box gene expression during female gametophyte and seed development in *Arabidopsis* // *Plant physiology*. – 2010. – T. 154. – №. 1. – C. 287-300.
16. Bidartondo M. I. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy // *New Phytologist*. – 2005. – T. 167. – №. 2. – C. 335-352.
17. Blackman B. K., Rasmussen D. A., Strasburg J. L., et al. Contributions of flowering time genes to sunflower domestication and improvement // *Genetics*. – 2011. – T. 187. – №. 1. – C. 271-287.
18. Boter, M., Golz, J. F., Giménez-Ibañez, S., et al. FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate // *The Plant Cell*. – 2015. – T. 27. – №. 11. – C. 3160-3174.
19. Bowman J. L. The YABBY gene family and abaxial cell fate // *Current opinion in plant biology*. – 2000. – T. 3. – №. 1. – C. 17-22.
20. Bowman J.L., Alvarez J., Weigel D., et al. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes // *Development*. – 1993. – T. 119. – №. 3. – C. 721-743.
21. Brausemann A., Gemmecker S., Koschmieder J., et al. Structure of phytoene desaturase provides insights into herbicide binding and reaction mechanisms involved in carotene desaturation // *Structure*. – 2017. – T. 25. – №. 8. – C. 1222-1232.
22. Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. – 2005. – T. 42. – №. 4. – C. 567-585.
23. Butelli E., Licciardello C., Zhang Y., et al. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges // *The Plant Cell*. – 2012. – T. 24. – №. 3. – C. 1242-1255.
24. Carlsen F. M., Johansen I. E., Yang Z., et al. Strategies for efficient gene editing in protoplasts of *Solanum tuberosum* theme: determining gRNA efficiency design by utilizing protoplast // *Frontiers in Genome Editing*. – 2022. – T. 3. – C. 795644.

25. Castelán-Muñoz N., Herrera J., Cajero-Sánchez W., et al. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – T. 10. – C. 853.
26. Castañón-Suárez C.A., Arrizubieta M., Castelán-Muñoz N., et al. The MADS-box genes SOC1 and AGL24 antagonize XAL2 functions in *Arabidopsis thaliana* root development // *Frontiers in Plant Science*. – 2024. – T. 15. – C. 1331269.
27. Chandler J., Corbesier L., Spielmann P., et al. Modulating flowering time and prevention of pod shatter in oilseed rape // *Molecular Breeding*. – 2005. – T. 15. – C. 87-94.
28. Chandrasekaran M., Boopathi T., Paramasivan M. A status-quo review on CRISPR-Cas9 gene editing applications in tomato // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – T. 190. – C. 120-129.
29. Chantret N., Cenci A., Sabot F., et al. Sequencing of the *Triticum monococcum* hardness locus reveals good microcolinearity with rice // *Molecular genetics and genomics*. – 2004. – T. 271. – C. 377-386.
30. Chen C., Begcy K., Liu K., et al. Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity // *Plant physiology*. – 2016. – T. 171. – №. 1. – C. 606-622.
31. Chen K., Li G.J., Bressan R.A., et al. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants // *Journal of integrative plant biology*. – 2020. – T. 62. – №. 1. – C. 25-54.
32. Chen L., Li W., Katin-Grazzini L., et al. A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants // *Horticulture research*. – 2018. – T. 5. – №. 13.
33. Chen L., Zhao Y., Xu S., et al. OsMADS57 together with OsTB1 coordinates transcription of its target OsWRKY94 and D14 to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice // *New Phytologist*. – 2018. – T. 218. – №. 1. – C. 219-231.
34. Chen R., Ma J., Luo D., et al. CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress // *Plant Science*. – 2019. – T. 280. – C. 164-174.
35. Chiang G. C., Barua D., Kramer E. M., et al. Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 28. – C. 11661-11666.
36. Chincinska I. A., Miklaszewska M., Sołtys-Kalina D. Recent advances and challenges in potato improvement using CRISPR/Cas genome editing // *Planta*. – 2023. – T. 257. – №. 1. – C. 25.
37. Choi J. Y., Purugganan M. D. Multiple origin but single domestication led to *Oryza sativa* // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2018. – T. 8. – №. 3. – C. 797-803.

38. Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *The Plant Journal*. – 2017. – T. 90. – №. 5. – C. 856-867.
39. Chu H., Liang W., Li J., et al. A CLE–WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – T. 64. – №. 17. – C. 5359-5369.
40. Ciaffi M., Paolacci A. R., Tanzarella O. A., Porceddu E. Molecular aspects of flower development in grasses // *Sexual Plant Reproduction*. – 2011. – T. 24. – C. 247-282.
41. Considine M. J., Foyer C. H. Redox regulation of plant development // *Antioxidants & redox signaling*. – 2014. – T. 21. – №. 9. – C. 1305-1326.
42. Cooke J. E. K., Eriksson M. E., Junttila O. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms // *Plant, cell & environment*. – 2012. – T. 35. – №. 10. – C. 1707-1728.
43. Cosio C., Ranocha P., Francoz E., et al. The class III peroxidase PRX 17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL 15) and participates in lignified tissue formation // *New Phytologist*. – 2017. – T. 213. – №. 1. – C. 250-263.
44. Cronk Q. C. B. Plant evolution and development in a post-genomic context // *Nature Reviews Genetics*. – 2001. – T. 2. – №. 8. – C. 607-619.
45. Cui Y., Zhao J., Gao Y., et al. Efficient multi-sites genome editing and plant regeneration via somatic embryogenesis in *Picea glauca* // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – T. 12. – C. 751891.
46. Dai M. Q., Zhao Y., Ma Q., et al. The rice *YABBY1* gene is involved in the feedback regulation of gibberellin metabolism // *Plant physiology*. – 2007. – T. 144. – №. 1. – C. 121-133.
47. Das Dangol S., Barakate A., Stephens J., et al. Genome editing of potato using CRISPR technologies: current development and future prospective // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2019. – T. 139. – C. 403-416.
48. Davies B., Di Rosa A., Eneva T., et al. Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes // *The Plant Journal*. – 1996. – T. 10. – №. 4. – C. 663-677.
49. De Bodt S., Raes J., Florquin K., et al. Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants // *Journal of molecular evolution*. – 2003. – T. 56. – C. 573-586.
50. DeBlasio S. L., Rebelo A.R., Parks K., et al. Disruption of chloroplast function through downregulation of phytoene desaturase enhances the systemic accumulation of an aphid-borne, phloem-restricted virus // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2018. – T. 31. – №. 10. – C. 1095-1110.

51. Ditta G., Pinyopich A., Robles P., et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity // *Current biology*. – 2004. – T. 14. – №. 21. – C. 1935-1940.
52. Dong T., Chen G., Tian S., et al. A non-climacteric fruit gene *CaMADS-RIN* regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 4. – C. e95559.
53. Dong X. et al. Genome-wide analysis of genes associated with bolting in heading type chinese cabbage // *Euphytica*. – 2016. – T. 212. – C. 65-82.
54. Duclos D. V., Björkman T. Meristem identity gene expression during curd proliferation and flower initiation in *Brassica oleracea* // *Journal of experimental botany*. – 2008. – T. 59. – №. 2. – C. 421-433.
55. Eckardt N. A. YABBY genes and the development and origin of seed plant leaves. // *Plant Cell*. – 2010. – T. 22. – №. 7. – C. 2103.
56. Efremov G. I., Slugina M. A., Shchennikova A. V., Kochieva E. Z. Differential regulation of phytoene synthase *PSY1* during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants*. – 2020. – T. 9. – №. 9. – C. 1169.
57. Elitzur T., Yakir E., Quansah L., et al. Banana MaMADS transcription factors are necessary for fruit ripening and molecular tools to promote shelf-life and food security // *Plant Physiology*. – 2016. – T. 171. – №. 1. – C. 380-391.
58. Elsharawy H., Refat M. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat: enhancing quality and productivity for global food security—a review // *Functional & Integrative Genomics*. – 2023. – T. 23. – №. 3. – C. 265.
59. Feng T., Wang L., Li L., et al. OsMADS14 and NF-YB1 cooperate in the direct activation of OsAGPL2 and Waxy during starch synthesis in rice endosperm // *New Phytologist*. – 2022. – T. 234. – №. 1. – C. 77-92.
60. Ferrándiz C., Liljegren S. J., Yanofsky M. F. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development // *Science*. – 2000. – T. 289. – №. 5478. – C. 436-438.
61. Ferrario S., Immink R.G., Shchennikova A., et al. The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in *petunia* // *The Plant Cell*. – 2003. – T. 15. – №. 4. – C. 914-925.
62. Ferrario S., Shchennikova A.V., Franken J., et al. Control of floral meristem determinacy in *petunia* by MADS-box transcription factors // *Plant Physiology*. – 2006. – T. 140. – №. 3. – C. 890-898.

63. Fiers M., Golemic E., Xu J., et al. The 14–amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway // *The Plant Cell*. – 2005. – T. 17. – №. 9. – C. 2542-2553.
64. Filyushin M. A., Slugina M. A., Kochieva E. Z. et al. Characteristics of INNER NO OUTER Homologous Genes in Wild Tomato Species // *Russian Journal of Genetics*. – 2019. – T. 55. – C. 253-258.
65. Finet C., Floyd S. K., Conway S. J., et al. Evolution of the YABBY gene family in seed plants // *Evolution & Development*. – 2016. – T. 18. – №. 2. – C. 116-126.
66. Flachowsky H., Peil A., Sopanen T., et al. Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus× domestica* Borkh.) // *Plant Breeding*. – 2007. – T. 126. – №. 2. – C. 137-145.
67. Fournier-Level A., Lacombe T., Le Cunff L., et al. Evolution of the VvMybA gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *Heredity*. – 2010. – T. 104. – №. 4. – C. 351-362.
68. Fujisawa M., Nakano T., Shima Y., Ito Y. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening // *The Plant Cell*. – 2013. – T. 25. – №. 2. – C. 371-386.
69. Gan Y., Filleur S., Rahman A., et al. Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 2005. – T. 222. – C. 730-742.
70. Gan Z., Wu X., Biahomba S.A.M., et al. Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Characterization of the Pepper (*Capsicum* spp.) MADS-box Gene Family // *Genes*. – 2022. – T. 13. – №. 11. – C. 2047.
71. Gao R., Wang Y., Gruber M.Y., Hannoufa A. miR156/SPL10 modulates lateral root development, branching and leaf morphology in *Arabidopsis* by silencing AGAMOUS-LIKE 79 // *Frontiers in plant science*. – 2018. – T. 8. – C. 2226.
72. Gasser C. S., Skinner D. J. Development and evolution of the unique ovules of flowering plants // *Current topics in developmental biology*. – 2019. – T. 131. – C. 373-399.
73. Gebhardt C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2016. – T. 129. – C. 2281-2294.
74. Giménez E., Pineda B., Capel J., et al. Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato // *PLoS One*. – 2010. – T. 5. – №. 12. – C. e14427.
75. Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y. Signals derived from YABBY gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems // *The Plant Cell*. – 2008. – T. 20. – №. 5. – C. 1217-1230.

76. Goto K., Meyerowitz E. M. Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA // *Genes & development*. – 1994. – T. 8. – №. 13. – C. 1548-1560.
77. Graham S. W., Lam V. K. Y., Merckx V. S. F. T. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes // *New Phytologist*. – 2017. – T. 214. – №. 1. – C. 48-55.
78. Greb T., Lohmann J. U. Plant stem cells // *Current biology*. – 2016. – T. 26. – №. 17. – C. R816-R821.
79. Grimplet J., Martínez-Zapater J. M., Carmona M. J. Structural and functional annotation of the MADS-box transcription factor family in grapevine // *BMC genomics*. – 2016. – T. 17. – C. 1-23.
80. Gross T., Broholm S., Becker A. CRABS CLAW acts as a bifunctional transcription factor in flower development // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – T. 9. – C. 835.
81. Guo X., Chen G., Cui B., et al. Solanum lycopersicum agamous-like MADS-box protein AGL15-like gene, SIMBP11, confers salt stress tolerance // *Molecular Breeding*. – 2016. – T. 36. – C. 1-15.
82. Hallahan B. F., Fernandez-Tendero E., Fort A., et al. Hybridity has a greater effect than paternal genome dosage on heterosis in sugar beet (*Beta vulgaris*) // *BMC plant biology*. – 2018. – T. 18. – C. 1-16.
83. Han H. Q., Liu Y., Jiang M. M., et al. Identification and expression analysis of YABBY family genes associated with fruit shape in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Genet Mol Res*. – 2015. – T. 14. – №. 2. – C. 7079-91.
84. Han X., Yin L., Xue H. Co-expression analysis identifies CRC and AP1 the regulator of Arabidopsis fatty acid biosynthesis // *Journal of integrative plant biology*. – 2012. – T. 54. – №. 7. – C. 486-499.
85. Hao L., Zhang J., Shi S., et al. Identification and expression profiles of the YABBY transcription factors in wheat // *PeerJ*. – 2022. – T. 10. – C. e12855.
86. Hellens R., Mullineaux P., Klee H. Technical focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors // *Trends in plant science*. – 2000. – T. 5. – №. 10. – C. 446-451.
87. Honma T., Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs // *Nature*. – 2001. – T. 409. – №. 6819. – C. 525-529.
88. Hou J., Long Y., Raman H., et al. A Tourist-like MITE insertion in the upstream region of the BnFLC. A10 gene is associated with vernalization requirement in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *BMC plant biology*. – 2012. – T. 12. – C. 1-13.

89. Hou J., Zhang H., Liu J., et al. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – T. 68. – №. 9. – C. 2317-2331.
90. Hou H., Wu P., Gao L., et al. Characterization and expression profile analysis of YABBY family genes in Pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) under abiotic stresses and hormone treatments // *Plant Growth Regulation*. – 2019. – T. 87. – C. 421-432.
91. Hu G., Koh J., Yoo M. J., et al. Proteomic profiling of developing cotton fibers from wild and domesticated *Gossypium barbadense* // *New Phytologist*. – 2013. – T. 200. – №. 2. – C. 570-582.
92. Huang B., Routaboul J. M., Liu M., et al. Overexpression of the class D MADS-box gene *Sl-AGL11* impacts fleshy tissue differentiation and structure in tomato fruits // *Journal of experimental botany*. – 2017. – T. 68. – №. 17. – C. 4869-4884.
93. Hugouvieux V., Silva C.S., Jourdain A., et al. Tetramerization of MADS family transcription factors *SEPALLATA3* and *AGAMOUS* is required for floral meristem determinacy in *Arabidopsis* // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – T. 46. – №. 10. – C. 4966-4977.
94. Hwang S.K., Singh S., Cakir B., et al. The plastidial starch phosphorylase from rice endosperm: catalytic properties at low temperature // *Planta*. – 2016. – T. 243. – C. 999-1009.
95. Immink R. G. H., Kaufmann K., Angenent G. C. The ‘ABC’ of MADS domain protein behaviour and interactions // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2010. – T. 21. – №. 1. – C. 87-93.
96. Irwin J.A., Soumpourou E., Lister C., et al. Nucleotide polymorphism affecting *FLC* expression underpins heading date variation in horticultural brassicas // *The Plant Journal*. – 2016. – T. 87. – №. 6. – C. 597-605.
97. Ito Y. et al. Re-evaluation of the *rin* mutation and the role of *RIN* in the induction of tomato ripening // *Nature plants*. – 2017. – T. 3. – №. 11. – C. 866-874.
98. Jack T., Brockman L. L., Meyerowitz E. M. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens // *Cell*. – 1992. – T. 68. – №. 4. – C. 683-697.
99. Jack T., Fox G. L., Meyerowitz E. M. *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity // *Cell*. – 1994. – T. 76. – №. 4. – C. 703-716.
100. Jang S., Hong M.Y., Chung Y.Y., An G.. Ectopic expression of tobacco MADS genes modulates flowering time and plant architecture // *Molecules and cells*. – 1999. – T. 9. – №. 6. – C. 576-586.

101. Ji W., Li G. R., Luo Y. X., et al. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between different ploidy grapes // *Genetics and Molecular Research*. – 2015. – T. 14. – №. 4. – C. 18616-18622.
102. Joshi S., Paul P., Hartman J.M., Perry S.E. AGL15 Promotion of somatic embryogenesis: Role and molecular mechanism // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – T. 13. – C. 861556.
103. Kakizaki T. et al. Identification of quantitative trait loci controlling late bolting in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) parental line Nou 6 gou // *Breeding Science*. – 2011. – T. 61. – №. 2. – C. 151-159.
104. Kaufmann K., Pajoro A., Angenent G. C. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches // *Nature Reviews Genetics*. – 2010. – T. 11. – №. 12. – C. 830-842.
105. Kempin S. A., Savidge B., Yanofsky M. F. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis* // *Science*. – 1995. – T. 267. – №. 5197. – C. 522-525.
106. Khong G. N., Pati P. K., Richaud F., et al. OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice // *Plant Physiology*. – 2015. – T. 169. – №. 4. – C. 2935-2949.
107. Klap C., Yeshayahou E., Bolger A. M., et al. Tomato facultative parthenocarpy results from Sl AGAMOUS-LIKE 6 loss of function // *Plant Biotechnology Journal*. – 2017. – T. 15. – №. 5. – C. 634-647.
108. Klocko A. L., Borejsza-Wysocka E., Brunner A. M., et al. Transgenic suppression of AGAMOUS genes in apple reduces fertility and increases floral attractiveness // *PLoS One*. – 2016. – T. 11. – №. 8. – C. e0159421.
109. Kord H, Shakib AM, Daneshvar MH, et al. RNAi-mediated down-regulation of *SHATTERPROOF* gene in transgenic oilseed rape // *3 Biotech*. – 2015. – T. 5. – C. 271-277.
110. Kusano H., Ohnuma M., Mutsuro-Aoki H., et al. Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 13753.
111. Kwantes M., Liebsch D., Verelst W. How MIKC* MADS-box genes originated and evidence for their conserved function throughout the evolution of vascular plant gametophytes // *Molecular biology and evolution*. – 2012. – T. 29. – №. 1. – C. 293-302.
112. Lee S., Woo Y.-M., Ryu S.-I., et al. Further characterization of a rice AGL12 group MADS-box gene, *OsMADS26* // *Plant physiology*. – 2008. – T. 147. – №. 1. – C. 156-168.

113. Lenhard M., Bohnert A., Jürgens G., Laux T. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS // *Cell*. – 2001. – T. 105. – №. 6. – C. 805-814.
114. Lenser T., Theißen G., Dittrich P. Developmental robustness by obligate interaction of class B floral homeotic genes and proteins // *Plos Computational Biology*. – 2009. – T. 5. – №. 1. – C. e1000264.
115. Li C., Wang Y., Xu L., et al. Genome-wide characterization of the MADS-box gene family in radish (*Raphanus sativus* L.) and assessment of its roles in flowering and floral organogenesis // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – T. 7. – C. 211403.
116. Li S., Xu H., Ju Z., et al. The RIN-MC fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes // *Plant Physiology*. – 2018. – T. 176. – №. 1. – C. 891-909.
117. Li S., Zhu B., Pirrello J., et al. Roles of RIN and ethylene in tomato fruit ripening and ripening-associated traits // *New Phytologist*. – 2020. – T. 226. – №. 2. – C. 460-475.
118. Li X. B., Yang C. C., Qiu N. W. Bioinformatic analysis of YABBY protein family in *Arabidopsis* and Chinese cabbage // *Shandong Agric Sci*. – 2012. – T. 44. – №. 12. – C. 1-6.
119. Li X., Xu S., Fuhrmann-Aoyagi M. B., et al. CRISPR/Cas9 technique for temperature, drought, and salinity stress responses // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2022. – T. 44. – №. 6. – C. 2664-2682.
120. Li X., Yu B., Wu Q., et al. OsMADS23 phosphorylated by SAPK9 confers drought and salt tolerance by regulating ABA biosynthesis in rice // *PLoS genetics*. – 2021. – T. 17. – №. 8. – C. e1009699.
121. Li Z., Reighard G. L., Abbott A. G., Bielenberg D. G. Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns // *Journal of experimental botany*. – 2009. – T. 60. – №. 12. – C. 3521-3530.
122. Liljegren S. J., Ditta G. S., Eshed Y., et al. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis* // *Nature*. – 2000. – T. 404. – №. 6779. – C. 766-770.
123. Litrico I., Violle C. Diversity in plant breeding: a new conceptual framework // *Trends in plant science*. – 2015. – T. 20. – №. 10. – C. 604-613.
124. Liu B., Zhang N., Wen Y., et al. Transcriptomic changes during tuber dormancy release process revealed by RNA sequencing in potato // *Journal of biotechnology*. – 2015. – T. 198. – C. 17-30.
125. Liu C., Chen H., Er H. L., et al. Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. // *Development*. – 2008. – T. 135. – C. 1481–1491.

126. Liu C., Xi W., Shen L., et al. Regulation of floral patterning by flowering time genes // *Developmental cell*. – 2009. – T. 16. – №. 5. – C. 711-722.
127. Liu J., Liu M., Wang J., et al. Transcription factor MaMADS36 plays a central role in regulating banana fruit ripening // *Journal of experimental botany*. – 2021. – T. 72. – №. 20. – C. 7078-7091.
128. Liu Z., Zhang D., Liu D., et al. Exon skipping of AGAMOUS homolog PrseAG in developing double flowers of *Prunus lannesiana* (Rosaceae) // *Plant cell reports*. – 2013. – T. 32. – C. 227-237.
129. Mashiguchi K., Seto Y., Yamaguchi S. Strigolactone biosynthesis, transport and perception // *The Plant Journal*. – 2021. – T. 105. – №. 2. – C. 335-350.
130. Mateos J.L., Madrigal P., Tsuda K., et al. Combinatorial activities of SHORT VEGETATIVE PHASE and FLOWERING LOCUS C define distinct modes of flowering regulation in *Arabidopsis* // *Genome biology*. – 2015. – T. 16. – C. 1-23.
131. Matres J. M., Hilscher J., Datta A., et al. Genome editing in cereal crops: an overview // *Transgenic research*. – 2021. – T. 30. – C. 461-498.
132. McConnell J. R., Barton M. K. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis* // *Development*. – 1998. – T. 125. – №. 15. – C. 2935-2942.
133. Mejía N., Soto B., Guerrero M., et al. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenopermocarpic seedlessness in grapevine // *BMC plant biology*. – 2011. – T. 11. – C. 1-19.
134. Meyerowitz E. M. Genetic control of cell division patterns in developing plants // *Cell*. – 1997. – T. 88. – №. 3. – C. 299-308.
135. Milla R., Bastida J.M., Turcotte M.M., et al. Phylogenetic patterns and phenotypic profiles of the species of plants and mammals farmed for food // *Nature ecology & evolution*. – 2018. – T. 2. – №. 11. – C. 1808-1817.
136. Morrell P. L., Buckler E. S., Ross-Ibarra J. Crop genomics: advances and applications // *Nature Reviews Genetics*. – 2012. – T. 13. – №. 2. – C. 85-96.
137. Müller F., Xu J., Kristensen L., et al. High-temperature-induced defects in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther and pollen development are associated with reduced expression of B-class floral patterning genes // *PLoS One*. – 2016. – T. 11. – №. 12. – C. e0167614.
138. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. – 1962. – T. 15. – №. 3. – C. 473-497.
139. Naing A. H., Kyu S.Y., Pe P.P.W., et al. Silencing of the phytoene desaturase (PDS) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes // *Plant methods*. – 2019. – T. 15. – C. 1-10.

140. Nakano T., Kimbara J., Fujisawa M., et al. MACROCALYX and JOINTLESS interact in the transcriptional regulation of tomato fruit abscission zone development // *Plant physiology*. – 2012. – T. 158. – №. 1. – C. 439-450.
141. Nezhdanova A. V. et al. Analysis of the structure and function of the tomato *Solanum lycopersicum* L. MADS-box gene *SIMADS5* // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2021a. – T. 25. – №. 5. – C. 492-501.
142. Nezhdanova A. V., Kamionskaya A. M., Shulga O. A., Shchennikova A. V. *Chrysanthemum SEP3*-like gene *CDM44* overexpression does not affect transgenic tobacco flowering, whereas enhances its tolerance to cold stress // *FEBS Open Bio*. – 2021b. – T. 11. – C. 287-287.
143. Nezhdanova A. V., Efremov G. I., Slugina M. A., et al. Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase *PHO1a* on potato growth and cold stress response // *Horticultrae*. – 2022. – T. 8. – №. 8. – C. 730.
144. Nezhdanova A.V., Kulakova A.V., Slugina M.A., et al. Effect of partial knockout of the plastid starch phosphorylase gene *NtPHO1-L1* on the metabolism of carbohydrates and carotenoids in *Nicotiana tabacum* L. leaves // *Russian Journal of plant physiology*. – 2024. – T. 71. – №. 5.
145. Nurani A. M., Ozawa Y., Furuya T., et al. Deep imaging analysis in VISUAL reveals the role of YABBY genes in vascular stem cell fate determination // *Plant and Cell Physiology*. – 2020. – T. 61. – №. 2. – C. 255-264.
146. Ocares N., Mejía N. Suppression of the D-class MADS-box *AGL11* gene triggers seedlessness in fleshy fruits // *Plant cell reports*. – 2016. – T. 35. – C. 239-254.
147. Olsen K. M., Wendel J. F. Crop plants as models for understanding plant adaptation and diversification // *Frontiers in plant science*. – 2013. – T. 4. – C. 290.
148. Pandolfini T. Seedless fruit production by hormonal regulation of fruit set // *Nutrients*. – 2009. – T. 1. – №. 2. – C. 168-177.
149. Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world // *The Plant Cell*. – 2003. – T. 15. – №. 7. – C. 1538-1551.
150. Paul P., Dhatt B. K., Miller M., et al. MADS78 and MADS79 are essential regulators of early seed development in rice // *Plant Physiology*. – 2020. – T. 182. – №. 2. – C. 933-948.
151. Paul P., Joshi S., Tian R., et al. The MADS-domain factor AGAMOUS-Like18 promotes somatic embryogenesis // *Plant Physiology*. – 2022. – T. 188. – №. 3. – C. 1617-1631.
152. Pelaz S., Ditta G. S., Baumann E., et al. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes // *Nature*. – 2000. – T. 405. – №. 6783. – C. 200-203.
153. Pelaz S., Gustafson-Brown C., Kohlami S.E., et al. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development // *The Plant Journal*. – 2001. – T. 26. – №. 4. – C. 385-394.

154. Peña L., Martín-Trillo M., Juárez J., et al. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time // *Nature biotechnology*. – 2001. – T. 19. – №. 3. – C. 263-267.
155. Perroud P. F., Guyon-Debast A., Veillet F., et al. Prime Editing in the model plant *Physcomitrium patens* and its potential in the tetraploid potato // *Plant Science*. – 2022. – T. 316. – C. 111162.
156. Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*. – 2003. – T. 424. – №. 6944. – C. 85-88.
157. Pnueli L., Hareven D., Broday L., et al. The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers // *The Plant Cell*. – 1994. – T. 6. – №. 2. – C. 175-186.
158. Porto D. D., Bruneau M., Perini P., et al. Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – T. 66. – №. 9. – C. 2659-2672.
159. Purugganan M. D. Evolutionary insights into the nature of plant domestication // *Current Biology*. – 2019. – T. 29. – №. 14. – C. R705-R714.
160. Qi X., Liu C., Song L., Li M. PaMADS7, a MADS-box transcription factor, regulates sweet cherry fruit ripening and softening // *Plant science*. – 2020. – T. 301. – C. 110634.
161. Riboni M., Test A. R., Galbiati M., et al. ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana* // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – T. 67. – №. 22. – C. 6309-6322.
162. Rijpkema A. S., Gerats T., Vandenbussche M. Evolutionary complexity of MADS complexes // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2007. – T. 10. – №. 1. – C. 32-38.
163. Romero Navarro J. A., Willcox M., Burgueño J., et al. A study of allelic diversity underlying flowering-time adaptation in maize landraces // *Nature genetics*. – 2017. – T. 49. – №. 3. – C. 476-480.
164. Rosin F.M., Hart J.K., Van Onckelen H., Hannapel D.J. Suppression of a vegetative MADS box gene of potato activates axillary meristem development // *Plant Physiology*. – 2003. – T. 131. – №. 4. – C. 1613-1622.
165. Sasaki R., Yamane H., Ooka T., et al. Functional and expressional analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot // *Plant physiology*. – 2011. – T. 157. – №. 1. – C. 485-497.
166. Sattler M. C., Carvalho C. R., Clarindo W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding // *Planta*. – 2016. – T. 243. – C. 281-296.

167. Schilling S., Pan S., Kennedy A., Melzer R. MADS-box genes and crop domestication: the jack of all traits // *Journal of Experimental Botany*. – 2018. – T. 69. – №. 7. – C. 1447-1469.
168. Schreiber L., Nader-Nieto A.C., Schönhals E.M., et al. SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2014. – T. 4. – №. 10. – C. 1797-1811.
169. Seymour G. B., Østergaard L., Chapman N. H., et al. Fruit development and ripening // *Annual review of plant biology*. – 2013. – T. 64. – C. 219-241.
170. Shao H. X., Chen H. F., Zhang D., et al. Identification, evolution and expression analysis of the YABBY gene family in apple (*Malus domestica* Borkh.) // *Acta Agriculturae Zhejiangensis*. – 2017. – T. 29. – №. 7. – C. 1129-1138.
171. Sharma S., Friberg M., Vogel P., et al. Pho1a (plastid starch phosphorylase) is duplicated and essential for normal starch granule phenotype in tubers of *Solanum tuberosum* L // *Frontiers in Plant Science*. – 2023. – T. 14. – C. 1220973.
172. Sharma V. K., Fletcher J. C. Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate // *Plant Physiology*. – 2002. – T. 129. – №. 1. – C. 31-39.
173. Shchennikova A. V., Slugina M. A., Beletsky A. V., et al. The YABBY genes of leaf and leaf-like organ polarity in leafless plant *Monotropa hypopitys* // *International Journal of Genomics*. – 2018. – T. 2018.
174. Shchennikova, A. V., Shulga, O. A., Immink, R., et al. Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-box genes, belonging to the APETALA1/FRUITFULL and SEPALLATA3 subfamilies // *Plant Physiology*. – 2004. – T. 134. – №. 4. – C. 1632-1641.
175. Shoaib N., Liu L., Ali A., et al. Molecular functions and pathways of plastidial starch phosphorylase (PHO1) in starch metabolism: current and future perspectives // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 19. – C. 10450.
176. Shulga O.A., Shchennikova A.V., Beletsky A.V., et al. Transcriptome-wide characterization of the MADS-box family in pinesap *Monotropa hypopitys* reveals flowering conservation in non-photosynthetic myco-heterotrophs // *Journal of plant growth regulation*. – 2018. – T. 37. – C. 768-783.
177. Siegfried K.R., Eshed Y., Baum S.F., et al. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis* // *Development*. – 1999. – T. 126. – №. 18. – C. 4117-4128.
178. Singh R., Low E. T., Ooi L. C., et al. The oil palm *SHELL* gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK // *Nature*. – 2013. – T. 500. – №. 7462. – C. 340-344.

179. Slugina M. A. Transcription factor ripening inhibitor and its homologs in regulation of fleshy fruit ripening of various plant species //Russian Journal of Plant Physiology. – 2021. – T. 68. – C. 783-799.
180. Slugina M.A., Dyachenko E.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Structural and functional diversification of SEPALLATA genes *TM5* and *RIN* in tomato species (section *Lycopersicon*) // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2020c. – T. 492. – №. 1. – C. 152-158.
181. Slugina M.A., Filyushin M.A., Meleshin A.A., et al. Differences in the amylase inhibitor gene *SbAI* expression in potato during long-term tuber cold storage and in response to short-term cold stress //Russian Journal of Genetics. – 2020b. – T. 56. – C. 375-378.
182. Slugina M.A., Meleshin A.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. The opposite effect of low temperature on the *Pho1a* starch phosphorylase gene expression in *Solanum tuberosum* L. tubers and *Petota* species leaves //American Journal of Potato Research. – 2020a. – T. 97. – C. 78-87.
183. Slugina, M. A., Filyushin, M. A., Shchennikova, A. V., et al. *FAS*, *YABBY2*, and *YABBY5* gene expression profile correlates with different fruit locule number in tomato // Russian Journal of Genetics. – 2020. – T. 56. – C. 410-416.
184. Smaczniak C., Immink R. G. H., Angenent G. C., Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies // Development. – 2012. – T. 139. – №. 17. – C. 3081-3098.
185. Smith A. M., Zeeman S. C. Starch: a flexible, adaptable carbon store coupled to plant growth //Annual Review of Plant Biology. – 2020. – T. 71. – №. 1. – C. 217-245.
186. Smith O., Nicholson W., Kistler L., et al. A domestication history of dynamic adaptation and genomic deterioration in Sorghum //Nature plants. – 2019. – T. 5. – №. 4. – C. 369-379.
187. Solovchenko A. E., Chivkunova O. B., Merzlyak M. N., Reshetnikova I. V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples // Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. – T. 48. – C. 693-700.
188. Song G., Han X., Ryner J.T., et al. Utilizing MIKC-type MADS-box protein SOC1 for yield potential enhancement in maize //Plant Cell Reports. – 2021. – T. 40. – C. 1679-1693.
189. Soyk S., Lemmon Z.H., Oved M., et al. Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene //Cell. – 2017. – T. 169. – №. 6. – C. 1142-1155.
190. Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems //Current biology. – 2009. – T. 19. – №. 11. – C. 909-914.
191. Stahle M.I., Kuehlich J., Staron L., et al. YABBYs and the transcriptional corepressors LEUNIG and LEUNIG_HOMOLOG maintain leaf polarity and meristem activity in Arabidopsis //The Plant Cell. – 2009. – T. 21. – №. 10. – C. 3105-3118.

192. Stewart W. N., Rothwell G. W. Paleobotany and the evolution of plants //Cambridge University Press. – 1993. – C. 1-521.
193. Strable J., Wallace J.G., Unger-Wallace E., et al. Maize YABBY genes drooping leaf1 and drooping leaf2 regulate plant architecture //The Plant Cell. – 2017. – T. 29. – №. 7. – C. 1622-1641.
194. Studer A., Zhao Q., Ross-Ibarra J., Doebley J. Identification of a functional transposon insertion in the maize domestication gene *tb1* // Nature genetics. – 2011. – T. 43. – №. 11. – C. 1160-1163.
195. Sun M., Li H., Li Y., et al. Tomato YABBY2b controls plant height through regulating indole-3-acetic acid-amido synthetase (GH3. 8) expression // Plant Science. – 2020. – T. 297. – C. 110530.
196. Sung S., Amasino R. M. Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization // Annu. Rev. Plant Biol. – 2005. – T. 56. – C. 491-508.
197. Swanson-Wagner R., Briskine R., Schaefer R., et al. Reshaping of the maize transcriptome by domestication // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 29. – C. 11878-11883.
198. Tao Z., Shen L., Liu C., et al. Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in Arabidopsis //The Plant Journal. – 2012. – T. 70. – №. 4. – C. 549-561.
199. Theißen G., Rümpler F., Gramzow L. Array of MADS-box genes: facilitator for rapid adaptation? //Trends in plant science. – 2018. – T. 23. – №. 7. – C. 563-576.
200. Tononi P., Möller M., Bencivenga S., Spada A. GRAMINIFOLIA homolog expression in *Streptocarpus rexii* is associated with the basal meristems in phyllomorphs, a morphological novelty in Gesneriaceae //Evolution & development. – 2010. – T. 12. – №. 1. – C. 61-73.
201. Torti S., Fornara F., Vincent C., et al. Analysis of the Arabidopsis shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering //The Plant Cell. – 2012. – T. 24. – №. 2. – C. 444-462.
202. Trevaskis B., Bagnall D. J., Ellis M. H., et al. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – T. 100. – №. 22. – C. 13099-13104.
203. Tsuji H., Taoka K., Shimamoto K. Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation // Current opinion in plant biology. – 2011. – T. 14. – №. 1. – C. 45-52.
204. van der Knaap E., Chakrabarti M., Chu Y. H., et al. What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape // Frontiers in Plant Science. – 2014. – T. 5. – C. 227.

205. Van Harsselaar J.K., Lorenz J., Senning M., et al. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *BMC genomics*. – 2017. – T. 18. – C. 1-18.
206. Verhage L. Diploid, triploid, tetraploid–chromatin organization in polyploid watermelon // *The Plant Journal*. – 2021. – T. 106. – №. 3. – C. 586-587.
207. Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., et al. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus // *Science*. – 2002. – T. 296. – №. 5566. – C. 343-346.
208. Wagner T., Windhövel U., Römer S. Transformation of tobacco with a mutated cyanobacterial phytoene desaturase gene confers resistance to bleaching herbicides // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2002. – T. 57. – №. 7-8. – C. 671-679.
209. Wang H., La Russa M., Qi L. S. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond // *Annual review of biochemistry*. – 2016b. – T. 85. – C. 227-264.
210. Wang Q., Reddy V. A., Panicker D., et al. Metabolic engineering of terpene biosynthesis in plants using a trichome-specific transcription factor *Ms YABBY 5* from spearmint (*Mentha spicata*) // *Plant biotechnology journal*. – 2016a. – T. 14. – №. 7. – C. 1619-1632.
211. Wang Y., Jiang H., Wang G. PHERES1 controls endosperm gene imprinting and seed development // *Trends in plant science*. – 2020. – T. 25. – №. 6. – C. 517-519.
212. Wang Y., Zhang J., Hu Z., et al. Genome-wide analysis of the MADS-box transcription factor family in *Solanum lycopersicum* // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – T. 20. – №. 12. – C. 2961.
213. Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., et al. LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis* // *Cell*. – 1992. – T. 69. – №. 5. – C. 843-859.
214. Whittaker C., Dean C. The FLC locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2017. – T. 33. – C. 555-575.
215. Wicke S., Muller K.F., dePamphilis C.W., et al. Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – T. 113. – №. 32. – C. 9045-9050.
216. Wu J., Wei K., Cheng F., et al. A naturally occurring InDel variation in *BraA. FLC. b* (*BrFLC2*) associated with flowering time variation in *Brassica rapa* // *BMC Plant Biology*. – 2012. – T. 12. – C. 1-9.
217. Wu J., Yang S., Chen N., et al. Nuclear translocation of *OsMADS25* facilitated by *OsNAR2. 1* in response to nitrate signals promotes rice root growth by targeting *OsMADS27* and *OsARF7* // *Plant Communications*. – 2023. – T. 4. – №. 6.

218. Wuest S. E. et al. Molecular basis for the specification of floral organs by APETALA3 and PISTILLATA // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 33. – C. 13452-13457.
219. Xiang J., Liu R. Q., Li T. M., et al. Isolation and characterization of two VpYABBY genes from wild Chinese *Vitis pseudoreticulata* // Protoplasma. – 2013. – T. 250. – №.6. – C. 1315-1325.
220. Xiao D., Zhao J. J., Hou X. L., et al. The Brassica rapa FLC homologue FLC2 is a key regulator of flowering time, identified through transcriptional co-expression networks // Journal of Experimental Botany. – 2013. – T. 64. – №. 14. – C. 4503-4516.
221. Xiao H., Jiang N., Schaffner E., et al. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit // science. – 2008. – T. 319. – №. 5869. – C. 1527-1530.
222. Xiong Y., Jiao Y. The diverse roles of auxin in regulating leaf development // Plants. – 2019. – T. 8. – №. 7. – C. 243.
223. Xu H., Xu L., Yang P., et al. Tobacco rattle virus-induced PHYTOENE DESATURASE (*PDS*) and Mg-chelatase H subunit (*ChlH*) gene silencing in *Solanum pseudocapsicum* L // PeerJ. – 2018. – T. 6. – C. e4424.
224. Yan L.Y., Zhang H.J., Zheng Y.Q., et al. Transcription factor OsMADS25 improves rice tolerance to cold stress // Yi Chuan= Hereditas. – 2021. – T. 43. – №. 11. – C. 1078-1087.
225. Yang C., Ma Y., Li J. The rice *YABBY4* gene regulates plant growth and development through modulating the gibberellin pathway // Journal of experimental botany. – 2016. – T. 67. – №. 18. – C. 5545–5556.
226. Yang H., Shi G., Li X., et al. Overexpression of a soybean YABBY gene, *GmFILA*, causes leaf curling in *Arabidopsis thaliana* // BMC plant biology. – 2019. – T. 19. – №. 1. – C. 234.
227. Yang Z., Gong Q., Wang L., et al. Genome-wide study of YABBY genes in upland cotton and their expression patterns under different stresses // Frontiers in Genetics. – 2018. – T. 9. – C. 33.
228. Yao J. L., Dong Y. H., Morris B. A. M. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 3. – C. 1306-1311.
229. Yoshida T., Mogami J., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants // Current opinion in plant biology. – 2014. – T. 21. – C. 133-139.

230. Zha K., Xie H., Ge M., et al. Expression of maize MADS transcription factor ZmES22 negatively modulates starch accumulation in rice endosperm //International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – T. 20. – №. 3. – C. 483.
231. Zhang H., Hou J., Liu J., et al. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting //Potato research. – 2014a. – T. 57. – C. 47-58.
232. Zhang H., Liu J., Hou J., et al. The potato amylase inhibitor gene Sb AI regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity //Plant Biotechnology Journal. – 2014b. – T. 12. – №. 7. – C. 984-993.
233. Zhang H., Zhao Y., Zhu J. K. Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response // Developmental Cell. – 2020b. – T. 55. – №. 5. – C. 529-543.
234. Zhang J., Hu Z., Yao Q., et al. A tomato MADS-box protein, SICMB1, regulates ethylene biosynthesis and carotenoid accumulation during fruit ripening // Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 3413.
235. Zhang L., Gase K., Baldwin I., Gális I. Enhanced fluorescence imaging in chlorophyll-suppressed tobacco tissues using virus-induced gene silencing of the phytoene desaturase gene //Biotechniques. – 2010. – T. 48. – №. 2. – C. 125-133.
236. Zhang S., Zhang J. S., Zhao J., He C. Distinct subfunctionalization and neofunctionalization of the B-class MADS-box genes in *Physalis floridana* //Planta. – 2015. – T. 241. – C. 387-402.
237. Zhang T., Li C., Li D., et al. Roles of YABBY transcription factors in the modulation of morphogenesis, development, and phytohormone and stress responses in plants // Journal of Plant Research. – 2020a. – T. 133. – №.6. – C. 751-763.
238. Zhang X.L., Yang Z.P., Zhang J., Zhang L.G. Ectopic expression of BraYAB1-702, a member of YABBY gene family in Chinese cabbage, causes leaf curling, inhibition of development of shoot apical meristem and flowering stage delaying in *Arabidopsis thaliana* //International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – T. 14. – №. 7. – C. 14872-14891.
239. Zhang Y., Cai W., Wang A., et al. MADS-box protein AGL8 interacts with chromatin-remodelling component SWC4 to activate thermotolerance and environment-dependent immunity in pepper //Journal of Experimental Botany. – 2023. – T. 74. – №. 12. – C. 3667-3683.
240. Zhao H.B., Jia H.M., Wang Y., et al. Genome-wide identification and analysis of the MADS-box gene family and its potential role in fruit development and ripening in red bayberry (*Morella rubra*) //Gene. – 2019. – T. 717. – C. 144045.
241. Zhao P. X., Miao Z. Q., Zhang J., et al. Arabidopsis MADS-box factor AGL16 negatively regulates drought resistance via stomatal density and stomatal movement //Journal of Experimental Botany. – 2020. – T. 71. – №. 19. – C. 6092-6106.

242. Zhao P. X., Zhang J., Chen S. Y., et al. Arabidopsis MADS-box factor AGL16 is a negative regulator of plant response to salt stress by downregulating salt-responsive genes // *New Phytologist*. – 2021. – Т. 232. – №. 6. – С. 2418-2439.
243. Zhao S. P., Lu D., Yu T. F., et al. Genome-wide analysis of the YABBY family in soybean and functional identification of GmYABBY10 involvement in high salt and drought stresses // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Т. 119. – С. 132-146.
244. Zohary D. Unconscious selection and the evolution of domesticated plants // *Economic botany*. – 2004. – Т. 58. – №. 1. – С. 5-10.
245. Zsogon A., Cermak T., Naves E. R., et al. De novo domestication of wild tomato using genome editing // *Nature biotechnology*. – 2018. – Т. 36. – №. 12. – С. 1211-1216.
246. Нежданова А. В., Щенникова А. В. Факторы транскрипции семейства MADS растений: связь с признаками доместикации и перспективы для селекции (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. – 2021. – Т. 56. – №. 5. – С. 823-842.
247. Нежданова А. В., Слугина М. А., Кулакова А. В., и др. Влияние мозаичного нокаутирования гена фитоиндесатуразы NtPDS на биосинтез каротиноидов у *Nicotiana tabacum* L // *Физиология растений*. – 2023. – Т. 70. – №. 6. – С. 601-611.
248. Рейвн П. Э., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. В 2 т. Под редакцией акад. А.Л. Тахтаджяна – М.: Мир, 1990. – Т. 2. – С. 344.
249. Сизенева Е. С., Шульга О. А., Щенникова А. В., Скрыбин К. Г. Функциональная диверсификация двух MADS генов NAM45 и NAM59 в подсолнечнике // *Доклады Академии наук*. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2013а. – Т. 451. – №. 1. – С. 114-114.
250. Сизенева Е. С., Шульга О. А., Щенникова А. В., Скрыбин К. Г. Функциональная роль MADS-фактора транскрипции NAM59 подсолнечника в развитии цветка // *Доклады Академии наук*. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2013б. – Т. 448. – №. 3. – С. 363-363.
251. Шульга О. А., Нескородов Я. Б., Щенникова А. В., и др. Эктопическая экспрессия гена NAM59 вызывает гомеозисные изменения репродуктивных органов цветка в подсолнечнике (*Helianthus annuus* L.) // *Доклады Академии наук*. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2015. – Т. 461. – №. 4. – С. 480-480.
252. Шульга О. А., Шенникова А. В. Ангенент Г. С., Скрыбин К. Г. MADS-гены, регулирующие морфогенез соцветия подсолнечника // *Онтогенез*. – 2008. – Т. 39. – №. 1. – С. 4-7.

253. Щенникова А. В., Шульга О. А., Ангенент Г. С., Скрыбин К. Г. О генетической регуляции развития соцветия хризантемы // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2003. – Т. 391. – №. 5. – С. 715-717.

254. Щенникова А. В., Шульга О. А., Сизенёва Е. С., и др. Диверсификация функциональной активности гомеозисного MADS-гена CDM37 хризантемы // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2011. – Т. 436. – №. 4. – С. 563-565.

255. Щенникова А. В., Камионская, А. М., Нежданова, А. В., и др. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 4. – С. 405-411.

Таблица 1 – Питательные среды

| Среда | Состав | Добавки (фитогормоны, аминокислоты) | Антибиотики (стоковые растворы) | Назначение |
|--------------------------|---|--|--|---|
| Соли и витамины MS | (Murashige and Skoog, 1962) | - | - | Основа сред для растительной культуры клеток |
| A2 | 1 X MS-соли, 1 X MS- витамины, 3% сахароза, 0,7 % Plant-агар, рН 5,5 | - | Канамицин (Km, 100 мг/мл в H ₂ O) Карбенициллин (Cb, 500 мг/мл в H ₂ O) | Культивирование растений <i>in vitro</i> . Использование при агробактериальной трансформации эксплантов. |
| A3 | 1 X MS-соли, 1 X MS- витамины, 2% глюкоза, 0,7 % Plant-агар, рН 5,5 | НУК (0,1 мг/мл в 0,1 N NaOH), БАП (1 мг/мл в 0,1 N NaOH) | Рифампицин (Rif, 25 мг/мл в EtOH) Тетрациклин (Tet, 12,5 мг/мл в EtOH) | Использование при агробактериальной трансформации эксплантов. |
| SIM | 1 X MS-соли, 1 X MS- витамины, 3% сахароза, 0,7 % Plant-агар, рН 5,5 | НУК (0,02 мг/мл в 0,1 N NaOH), БАП (1 мг/мл в 0,1 N NaOH) Зеатин (1 мг/мл в mQ) | Хлорамфенико л (Cm, 34 мг/мл в EtOH) Ампициллин (Amp, 100 мг/мл в H ₂ O) | |
| LB | Бакто-триптон (10 г/л) Дрожжевой экстракт (5 г/л) NaCl (10 г/л) 1,5% Васто-агар рН 7,0 | | | Выращивание бактериальной и агробактериальной культур |
| SD | Дрожжевые азотистые основания 6,7 г растворяли в 860 мл mQ, добавляли 15-20 г Yeast-агара, рН 5,8-6,0 | Добавить: 100 мл 10 X раствора аминокислот, 40 мл 50% glucose | - | Культивирование дрожжевого штамма |

Сокращения: НУК – альфа-нафтилуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин

Примечание: Стоковые растворы антибиотиков и фитогормонов, а также растворы 50% глюкозы и Dropout solution, стерилизовали с помощью фильтрования (milliPore, 0,22 мкм) и добавляли в нужном количестве в предварительно автоклавированные питательные среды

Таблица 2 – Праймеры, использованные в работе

| Ген | Последовательность (5'→3') | Назначение |
|----------------|--|------------------|
| <i>NtPDS</i> | TGCATTGATTATCCAAGACCAG GTTTGTGACCAGCATCTGC | ПЦР-амплификация |
| <i>SIMADS5</i> | TAATCAGAATTCATGGGAAGGGGTAGGGTTGA TTGCATGTCTGACTCAAGGCAACCAGCCAGCCA | |
| <i>TAGL1</i> | TAATCAGAATTCATGGTTTTTCCTA TTGCATTGTCTGACTCAGACAAGCTGGAGAGGAG | |
| <i>FUL2</i> | TAATCAGAATTCATGGGTAGAGGAAGAGTACA TTGGATGTCTGACTTAACCGTTGAGATGGCGAA | |
| <i>PHO1a</i> | <i>stp4f</i> ATAGGAGCCAGATGCTGCTC <i>stp5exR</i> CAGCGTTTGCTTGGGCTTCACA | |
| <i>MhyFIL1</i> | CATCATGTCCTCCTCAAATTCTT CTTCTTGATTAGTAGGGGGACACA | |
| <i>MhyFIL3</i> | CATCATGTCCTCCTCAAATTCTT CTTCTTGATTAGTAGGGGGAGACC | |
| <i>CDM37</i> | ATGGCAAATTCTGATGCT TTACAATAACTGGAGAGG | |
| <i>CDM86</i> | ATGGGTAGGGGAAAGATA TCACATCCTCTCATGCAA | |
| <i>CDM115</i> | GGTCGACATGGCTAGAGGAAAGATCCAG GGTCGACCTAGCCAAGCAAGGA | |
| <i>CDM44</i> | ACGATGCCAATAGGACCTTG ACTTGGCCCTGCTACTGATG | |
| <i>HAM45</i> | TTCGTGCGAAAAAGAATGAA AGACCATCGAAGGACTGGTG | |
| <i>HAM59</i> | GCCAAAGCGAGAAAATGAGT TGGAGAGGGGTTTGATCTTG | |
| <i>NtPDS</i> | GCTCTTCCTGCGCCATTAAATG CTTGCTTTCTCATCCAGTCCTT | |
| <i>NtPSY2</i> | AACTGGACTCTGCTAGTAGATG GCACAAGAGATTTTGCATAAGCA | РВ-ПЦР |
| <i>NtZDS</i> | CAGCAGATACGTGATTTGGAT ACAGTCAATGAATCCAAGAGCA | |

| | |
|----------------------|---|
| <i>NtCRTISO</i> | ATGAAGCAAAGAAAGAGCTTGT GCAAGGTATCGTCTATGTGTCT |
| <i>NtCrtRBI</i> | ACTATGGTTTCTTCCATAAAGGCCT GCGGCCACCTTCTTAAATAAG |
| <i>NtVDE</i> | CCTGACGAAACGGAATGTCAG AGTCACCAACATCAGATTTACGA |
| <i>NtWUS</i> | CTTCTCATGGTGTACTGGCC CAGTTCCTCATAATCGTCTACTAG |
| <i>NtSEP1</i> | GCAACATGCTCAATCTCAGG TTGGGCATTTGTTACTGCTG |
| <i>NtSEP2</i> | AATAATGGCGGAACAGATGG TGGATCAGGTTACATTCCA |
| <i>NtSEP3</i> | TCACTTGAGAGGCAGCTTGA CATCGCCCTGAGTTTGAGTT |
| <i>NtAGL8</i> | ATCAGTGGGATCAGCAGAACCA ACCTCCTTCCACTTCTCCATTATC |
| <i>NtMADS23-like</i> | CAATTGGCAACTCCAACTTCTGAG CGTCCTTTCTTACACGAACACCA |
| <i>Nt-actin-7</i> | ACAGTGTCTGGATTGGAGGATC GAAGCACTTCCTGTGGACAATG |
| <i>NtAPI</i> | AGGACCTGCAAACTTGGAA TGATTTTGCTGATGCCATTC |
| <i>NtLFY</i> | TAATGCCCTTGACGCTCTCT TCGACACCACCTTCTCCTC |
| <i>NtAG</i> | ATGAGCTGCTGTTTGCTGAA TGAACTCCCTGGCATCAAGT |
| <i>NtPLE</i> | GCCATTGGTAGAGTCCGTTC AGCTGGAGAGCAGTTTGGTC |
| <i>SIMADS5</i> | GCCAAATGCACAAGATGTGGG CCAGCCATGTAGTTATTCACAC |
| <i>ELF1</i> | ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA |
| <i>PHO1a</i> | ATCTGCTTTCAATGCTGGAG TTGCTTCAACCGAAGGATC |

| | | |
|------------------|--|-----------------------------------|
| <i>StBAM1</i> | CCGGGAGAGTATAATTGGGG ACAACCCACCTTGGAAGAGG | |
| <i>StBAM9</i> | GGAACCACTGGAGACATCAATG ATGGATTGTGATGAGAAGGATAGC | |
| <i>StAI</i> | TTGTAACATGGCTCGCGTTC TGTTGGTGAAGCACTTGGAG | |
| <i>SEC3A</i> | GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTCCGCA | |
| <i>StFUL1</i> | ATCAGTGGGATCAGCAGAACCA ACCTCCTTCCACTTCTCCATTATC | |
| <i>StFUL2</i> | GCCACACCCCTTTAACAACC GCCGCGATGATCCTTCAACT | |
| <i>StMADS23</i> | CAATTGGCAACTCCA ACTTCTGAG CGTCCTTTCTTACACGAACACCA | |
| <i>StSOC1</i> | TGAGGGAGAAGTTTGGTGGTC CTTACTCTGCACTCCGGTGG | |
| <i>NOS-T (R)</i> | CGAATTCCC GGGATCTAGTAACATAGATGAC | ПЦР на трансген |
| <i>NPTII</i> | TTGTCACTGAAGCGGGAAGG ATATCACGGGTAGCCAACGC | |
| <i>VirB</i> | GGCTACATCGAAGATCGTATGAATG GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC | |
| | | ПЦР на агробактериальную инфекцию |

Таблица 3 – Характеристики трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *CDM51*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3* в смысловой ориентации

| № п/п | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян*, мг |
|---------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|----------------|
| <i>CDM51s</i> | | | | | | |
| 1 | 115 | 120 | 50 | 13 | 8 | 119 |
| 2 | 450 | 58 | 23 | 11 | 7 | 186 |
| Среднее | 282,5 | 89 | 36,5 | 12 | 7,5 | 152,5 |
| <i>FIL1s</i> | | | | | | |
| 1 | 208 | 77 | 32 | 7 | 3 | 202 |
| 2 | 150 | 130 | 32 | 11 | 7 | 214 |
| 3 | 65 | 144 | 33 | 25 | 19 | 175 |
| Среднее | 141 | 117 | 32,3 | 14,3 | 9,6 | 197 |
| <i>FIL3s</i> | | | | | | |
| 1 | 138 | 94 | 37 | 6 | 4 | 196 |
| 2 | 130 | 103 | 33 | 5 | 3 | 147 |
| 3 | 122 | 112 | 31 | 15 | 10 | 198 |
| 4 | 110 | 146 | 40 | 12 | 8 | 193 |
| 5 | 96 | 151 | 33 | 23 | 16 | 244 |
| 6 | 102 | 115 | 41 | 11 | 6 | 184 |
| 7 | 108 | 142 | 33 | 20 | 15 | 268 |
| 8 | 102 | 130 | 31 | 20 | 14 | 226 |
| 9 | 168 | 91 | 33 | 7 | 4 | 172 |
| Среднее | 119,5 | 120,3 | 32 | 13,2 | 8,8 | 203 |

* вес семян с одной семенной коробочки

Таблица 4 – Характеристики растений табака контрольной линии

| № п/п | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|---------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| 1 | 46 | 155 | 40 | 31 | 24 | 196 |
| 2 | 46 | 150 | 36 | 36 | 29 | 216 |
| 3 | 46 | 149 | 40 | 29 | 23 | 174 |
| 4 | 56 | 135 | 30 | 57 | 42 | 212 |
| 5 | 39 | 117 | 35 | 36 | 27 | 216 |
| 6 | 66 | 142 | 38 | 61 | 44 | 199 |
| 7 | 66 | 140 | 39 | 54 | 42 | 169 |
| 8 | 47 | 138 | 36 | 75 | 50 | 188 |
| 9 | 49 | 133 | 41 | 78 | 63 | 167 |
| Среднее | 53,83 | 134,17 | 36,5 | 60,17 | 44,67 | 191,83 |

Таблица 5 – Характеристики трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов в антисмысловой ориентации

| № п/п | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>CDM51as</i> | | | | | | |
| 1 | 37 | 99 | 31 | 36 | 24 | 186 |
| 2 | 44 | 137 | 35 | 212 | 40 | 115 |
| 3 | 56 | 140 | 45 | 56 | 43 | 160 |
| 4 | 38 | 124 | 33 | 50 | 38 | 148 |
| 5 | 47 | 127 | 33 | 41 | 26 | 175 |
| 6 | 34 | 121 | 28 | 54 | 43 | 135 |
| 7 | 67 | 135 | 38 | 45 | 31 | 44 |
| 8 | 38 | 116 | 29 | 42 | 32 | 148 |
| 9 | 52 | 136 | 37 | 142 | 30 | 88 |
| 10 | 53 | 107 | 31 | 26 | 17 | 218 |
| 11 | 45 | 145 | 36 | 60 | 44 | 213 |
| 12 | 56 | 137 | 40 | 45 | 34 | 104 |
| 13 | 36 | 107 | 36 | 40 | 28 | 200 |
| 14 | 56 | 127 | 37 | 59 | 44 | 190 |
| 15 | 70 | 120 | 33 | 27 | 17 | 207 |
| 16 | 55 | 129 | 36 | 38 | 25 | 114 |
| 17 | 40 | 139 | 35 | 56 | 41 | 191 |
| 18 | 36 | 112 | 33 | 59 | 42 | 237 |
| Среднее | 47,78 | 125,44 | 34,78 | 60,44 | 33,28 | 159,61 |

Таблица 6 – Характеристики растений табака *FIL1as* и *FIL3as*, давших семена

| № п/п | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|---------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>FIL1as</i> | | | | | | |
| 1 | 110 | 129 | 33 | 20 | 14 | 226 |
| 2 | 130 | 155 | 39 | 15 | 15 | 267 |
| 3 | 102 | 145 | 38 | 20 | 15 | 195 |
| 4 | 102 | 138 | 36 | 19 | 14 | 224 |
| 5 | 122 | 150 | 41 | 15 | 11 | 214 |
| Среднее | 113,2 | 143,4 | 36,5 | 17,8 | 13,8 | 225 |
| <i>FIL3as</i> | | | | | | |
| 1 | 168 | 75 | 29 | 15 | 8 | 85 |
| 2 | 320 | 106 | 55 | 12 | 7 | 150 |
| 3 | 289 | 118 | 43 | 9 | 5 | 220 |
| 4 | 80 | 97 | 27 | 17 | 14 | 180 |
| 5 | 110 | 129 | 34 | 14 | 11 | 240 |
| 6 | 54 | 81 | 25 | 15 | 10 | 215 |
| 7 | 48 | 75 | 30 | 32 | 22 | 263 |
| 8 | 65 | 98 | 27 | 17 | 12 | 211 |
| 9 | 102 | 91 | 29 | 13 | 9 | 204 |

| | | | | | | |
|---------|--------|-----|-------|-------|------|-------|
| 10 | 102 | 86 | 25 | 10 | 5 | 198 |
| 11 | 304 | 111 | 53 | 7 | 4 | 152 |
| Среднее | 149,27 | 97 | 33,71 | 14,64 | 9,73 | 192,5 |

Таблица 7 – Характеристики линий табака T₀ *SIMADS5as* и *SIMADS5s* в сравнении с контролем

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|------------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>SIMADS5as</i> | | | | | | |
| 1 | 212 | 114 | 40 | 8 | 6 | 201 |
| 2 | 86 | 83 | 22 | 12 | 9 | 123 |
| 3 | 108 | 104 | 26 | 8 | 6 | 199 |
| Среднее | 135,3 | 100,3 | 29,3 | 9,3 | 7 | 174,3 |
| <i>SIMADS5s</i> | | | | | | |
| 1 | 56 | 83 | 34 | 16 | 11 | 204 |
| 3 | 54 | 81 | 24 | 21 | 14 | 219 |
| 7 | 122 | 147 | 40 | 12 | 9 | 198 |
| 8 | 108 | 89 | 28 | 10 | 8 | 217 |
| 11 | 48 | 48 | 21 | 15 | 6 | 86 |
| 12 | 108 | 80 | 26 | 13 | 9 | 228 |
| 13 | 158 | 84 | 31 | 14 | 9 | 102 |
| 16 | 122 | 49 | 31 | 5 | 2 | 180 |
| 17 | 110 | 88 | 50 | 10 | 8 | 197 |
| 19 | 150 | 129 | 40 | 11 | 9 | 188 |
| 20 | 110 | 98 | 32 | 10 | 5 | 218 |
| 21 | 168 | 121 | 36 | 8 | 6 | 202 |
| 22 | 110 | 149 | 31 | 15 | 11 | 122 |
| 23 | 115 | 111 | 33 | 13 | 9 | 209 |
| 24 | 212 | 63 | 46 | 5 | 2 | 96 |
| 25 | 297 | 128 | 57 | 11 | 7 | 158 |
| Среднее | 128 | 96,75 | 35 | 11,81 | 7,81 | 176,5 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 46 | 155 | 40 | 31 | 24 | 196 |
| 2 | 46 | 150 | 36 | 36 | 29 | 216 |
| 3 | 46 | 149 | 40 | 29 | 23 | 174 |
| 4 | 56 | 135 | 30 | 57 | 42 | 212 |
| 5 | 39 | 117 | 35 | 36 | 27 | 216 |
| 6 | 66 | 142 | 38 | 61 | 44 | 199 |
| 7 | 66 | 140 | 39 | 54 | 42 | 169 |
| 8 | 47 | 138 | 36 | 75 | 50 | 188 |
| 9 | 49 | 133 | 41 | 78 | 63 | 167 |
| Среднее | 53,83 | 134,17 | 36,5 | 60,17 | 44,67 | 191,83 |

Таблица 8 – Характеристика растений табака линий S5-16 и S517 (Т₁ SIMADS5s)

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|--------------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>SIMADS5s-16</i> | | | | | | |
| 1 | 258 | 142 | 52 | 9 | 6 | 182 |
| 2 | 114 | 138 | 37 | 11 | 9 | 189 |
| 3 | 107 | 126 | 35 | 14 | 11 | 224 |
| 5 | 393 | 139 | 57 | 6 | 3 | |
| 6 | 153 | 77 | 44 | 8 | 6 | 143 |
| 7 | 181 | 74 | 47 | 7 | 5 | 91 |
| 8 | 157 | 79 | 50 | 7 | 6 | 175 |
| Среднее | 194,71 | 110,71 | 46 | 8,86 | 6,57 | 167,3 |
| <i>SIMADS5s-17</i> | | | | | | |
| 1 | 276 | 83 | 50 | 6 | 3 | 164 |
| 2 | 139 | 124 | 37 | 11 | 8 | 151 |
| 3 | 95 | 105 | 30 | 18 | 15 | 152 |
| 4 | 279 | 34 | 45 | 6 | 3 | 119 |
| 5 | 159 | 123 | 37 | 11 | 8 | 200 |
| 6 | 99 | 104 | 35 | 15 | 12 | 214 |
| 7 | 321 | 114 | 39 | 7 | 5 | 126 |
| 8 | 117 | 127 | 39 | 14 | 12 | 205 |
| 9 | 147 | 86 | 31 | 6 | 4 | 154 |
| Среднее | 181,3 | 100 | 38,1 | 10,4 | 7,78 | 165 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 124 | 164 | 46 | 12 | 9 | 165 |
| 2 | 137 | 156 | 43 | 11 | 8 | 179 |
| 3 | 139 | 139 | 41 | 10 | 7 | 140 |
| 4 | 80 | 106 | 37 | 21 | 17 | 121 |
| 5 | 139 | 135 | 36 | 17 | 11 | 70 |
| 6 | 84 | 105 | 32 | 18 | 14 | 166 |
| 7 | 147 | 111 | 42 | 10 | 6 | 179 |
| 8 | 103 | 97 | 38 | 7 | 5 | 120 |
| 9 | 84 | 102 | 30 | 14 | 10 | 135 |
| Среднее | 115,2 | 123,89 | 38,3 | 13,3 | 9,67 | 141 |

Таблица 9 – Характеристики растений табака пяти линий табака CDM44s

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. |
|-------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|
| Линия 44-2 | | | | | |
| 1 | 99 | 95 | 39 | 26 | 20 |
| 2 | 213 | 90 | 47 | 10 | 7 |
| 3 | 93 | 110 | 39 | 59 | 48 |
| 4 | 117 | 110 | 43 | 49 | 36 |
| 5 | 106 | 100 | 39 | 26 | 20 |
| 6 | 92 | 110 | 42 | 51 | 28 |
| 7 | 106 | 115 | 39 | 51 | 40 |
| 8 | 90 | 110 | 40 | 55 | 47 |
| 9 | 94 | 115 | 40 | 51 | 40 |
| 10 | 113 | 95 | 33 | 25 | 20 |
| Среднее | 112,3 | 104,4 | 40,1 | 40,3 | 30,6 |
| Линия 44-33 | | | | | |
| 1 | 108 | 100 | 34 | 19 | 15 |
| 2 | 64 | 100 | 27 | 41 | 34 |
| 3 | 80 | 110 | 42 | 56 | 46 |
| 4 | 79 | 120 | 36 | 52 | 40 |
| 5 | 68 | 100 | 36 | 51 | 42 |
| 6 | 80 | 105 | 36 | 41 | 29 |
| 7 | 97 | 95 | 35 | 31 | 26 |
| 8 | 84 | 90 | 36 | 25 | 16 |
| 9 | 87 | 90 | 38 | 44 | 28 |
| 10 | 92 | 110 | 44 | 45 | 33 |
| Среднее | 83,9 | 102 | 36,4 | 40,5 | 30,9 |
| Линия 44-25 | | | | | |
| 1 | 81 | 110 | 36 | 68 | 49 |
| 2 | 94 | 115 | 42 | 40 | 29 |
| 3 | 84 | 110 | 40 | 47 | 37 |
| 4 | 84 | 120 | 45 | 58 | 47 |
| 5 | 88 | 115 | 40 | 52 | 32 |
| 6 | 86 | 110 | 37 | 63 | 37 |
| 7 | 84 | 120 | 39 | 57 | 28 |
| 8 | 91 | 120 | 37 | 57 | 36 |
| 9 | 86 | 115 | 38 | 70 | 44 |
| 10 | 86 | 110 | 41 | 63 | 36 |
| Среднее | 86,4 | 114,5 | 39,5 | 57,5 | 37,5 |
| Линия 44-31 | | | | | |
| 1 | 91 | 115 | 41 | 110 | 66 |
| 2 | 94 | 120 | 41 | 84 | 60 |
| 3 | 124 | 100 | 35 | 54 | 46 |

| | | | | | |
|-------------|---------|--------|--------|------|--------|
| 4 | 108 | 95 | 36 | 29 | 22 |
| 5 | 130 | 90 | 37 | 25 | 17 |
| 6 | 122 | 85 | 28 | 59 | 53 |
| 7 | 124 | 95 | 33 | 42 | 27 |
| 8 | 190 | 80 | 33 | 21 | 8 |
| Среднее | 122,875 | 97,5 | 35,5 | 53 | 37,375 |
| Линия 44-52 | | | | | |
| 1 | 97 | 90 | 34 | 24 | 20 |
| 2 | 142 | 95 | 38 | 20 | 14 |
| 3 | 114 | 85 | 39 | 21 | 16 |
| 4 | 114 | 85 | 34 | 26 | 21 |
| 5 | 134 | 90 | 35 | 19 | 15 |
| 6 | 146 | 90 | 40 | 13 | 10 |
| 7 | 108 | 120 | 43 | 42 | 32 |
| 8 | 94 | 110 | 40 | 59 | 52 |
| Среднее | 118,625 | 95,625 | 37,875 | 28 | 22,5 |
| Контроль | | | | | |
| 1 | 42 | 116 | 33 | 28 | 19 |
| 2 | 37 | 110 | 28 | 28 | 20 |
| 3 | 46 | 101 | 30 | 15 | 11 |
| 4 | 48 | 113 | 32 | 22 | 17 |
| 5 | 36 | 113 | 36 | 26 | 19 |
| Среднее | 41,8 | 110,6 | 31,8 | 23,8 | 17,2 |

Таблица 10 – Характеристики растений табака линии 13-1-1

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|--------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Линия 13-1-1 | | | | | | |
| 3 | 225 | 80 | 41 | 9 | 5 | 104 |
| 4 | 92 | 62 | 27 | 14 | 1 | 57 |
| 5 | 349 | 108 | 44 | 16 | 1 | 170 |
| 6 | 160 | 89 | 33 | 6 | 1 | 72 |
| Среднее | 206,5 | 84,75 | 36,25 | 11,25 | 2 | 100,75 |
| Линия 13-1-4 | | | | | | |
| 1 | 148 | 80 | 37 | 8 | 4 | 153 |
| 7 | 220 | 74 | 41 | 6 | 4 | 98 |
| 8 | 95 | 72 | 23 | 20 | 0 | 0 |
| Среднее | 154,3 | 75,3 | 33,7 | 11,3 | 2,7 | 83,67 |
| Линия 13-1-7 | | | | | | |
| 3 | 214 | 79 | 32 | 8 | 4 | 140 |
| 4 | 305 | 105 | 42 | 8 | 5 | 75 |
| 6 | 227 | 177 | 47 | 9 | 6 | 167 |
| Среднее | 248,7 | 120,3 | 40,3 | 8,3 | 5 | 127,3 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 147 | 154 | 38 | 10 | 6 | 166 |
| 2 | 223 | 131 | 44 | 8 | 6 | 179 |
| 3 | 174 | 127 | 40 | 10 | 7 | 171 |
| 4 | 128 | 120 | 35 | 10 | 8 | 161 |
| 5 | 145 | 112 | 37 | 11 | 5 | 136 |
| Среднее | 163,4 | 128,8 | 38,8 | 9,8 | 6,4 | 162,6 |

Таблица 11 – Характеристики исследуемых линий табака линии 37-33

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. |
|----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|
| Линия 37-33 | | | | | |
| 1 | 149 | 186 | 52 | 10 | 6 |
| 2 | 146 | 143 | 46 | 11 | 8 |
| 3 | 159 | 144 | 58 | 15 | 10 |
| 4 | 139 | 145 | 35 | 18 | 15 |
| 5 | 161 | 138 | 47 | 10 | 8 |
| 6 | 167 | 134 | 48 | 13 | 10 |
| 7 | 247 | 172 | 57 | 7 | 4 |
| 8 | 162 | 119 | 43 | 17 | 14 |
| 9 | 201 | 149 | 52 | 14 | 10 |
| 10 | 120 | 108 | 30 | 22 | 14 |
| Среднее | 165,1 | 143,8 | 46,8 | 13,7 | 9,9 |
| Линия 37-1-7-8 | | | | | |
| 1 | 127 | 88 | 31 | 8 | 5 |
| 2 | 291 | 142 | 51 | 11 | 2 |
| 3 | 105 | 77 | 33 | 8 | 7 |
| 4 | 162 | 120 | 41 | 13 | 2 |
| 5 | 120 | 102 | 33 | 14 | 10 |
| 6 | 118 | 86 | 30 | 13 | 12 |
| 7 | 146 | 124 | 40 | 6 | 5 |
| 8 | 99 | 99 | 29 | 15 | 6 |
| 9 | 134 | 138 | 38 | 22 | 14 |
| 10 | 99 | 102 | 29 | 24 | 9 |
| Среднее | 140,1 | 107,8 | 35,5 | 13,4 | 7,2 |
| Контроль | | | | | |
| 1 | 139 | 131 | 42 | 14 | 11 |
| 2 | 169 | 150 | 44 | 6 | 6 |
| 3 | 161 | 154 | 41 | 14 | 9 |
| 4 | 146 | 143 | 39 | 14 | 10 |
| 5 | 127 | 130 | 34 | 17 | 16 |
| 6 | 109 | 155 | 39 | 14 | 14 |
| 7 | 113 | 132 | 28 | 19 | 15 |
| 8 | 132 | 126 | 32 | 12 | 7 |
| 9 | 161 | 146 | 39 | 10 | 8 |
| Среднее | 139,67 | 140,78 | 37,56 | 13,33 | 10,67 |

Таблица 12 – Характеристики растений табака *НАМ45s* x *НАМ59s* x *СДМ44s*

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|-----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Линия 13-1-1-17 | | | | | | |
| 2 | 64 | 115 | 34 | 18 | 13 | 216 |
| 8 | 73 | 111 | 38 | 19 | 15 | 234 |
| 10 | 101 | 97 | 24 | 36 | 0 | 0 |
| Среднее | 79,33 | 107,67 | 32 | 24,33 | 9,33 | 150 |
| Линия 13-1-1-64 | | | | | | |
| 3 | 90 | 108 | 34 | 8 | 6 | 185 |
| 5 | 108 | 87 | 22 | 17 | 15 | 132 |
| Среднее | 99 | 97,5 | 28 | 12,5 | 10,5 | 158,5 |
| Линия 13-1-1-82 | | | | | | |
| 2 | 80 | 81 | 21 | 14 | 10 | 128 |
| 6 | 120 | 120 | 28 | 20 | 15 | 225 |
| 8 | 90 | 114 | 47 | 18 | 13 | 93 |
| 10 | 108 | 98 | 35 | 18 | 16 | 134 |
| Среднее | 99,5 | 103,25 | 32,75 | 17,5 | 13,5 | 145 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 76 | 114 | 36 | 26 | 20 | 174 |
| 2 | 90 | 133 | 33 | 23 | 16 | 143 |
| 3 | 76 | 95 | 31 | 12 | 8 | 139 |
| 4 | 73 | 98 | 29 | 20 | 16 | 215 |
| Среднее | 78,75 | 110 | 32,25 | 20,25 | 15 | 167,75 |

Таблица 13 – Характеристики линий табака поколения T₀ со сверхэкспрессией гена *CDM86*

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>CDM86s</i> | | | | | | |
| 1 | 34 | 122 | 30 | 96 | 69 | 120 |
| 3 | 34 | 125 | 33 | 72 | 52 | 253 |
| 4 | 36 | 132 | 36 | 69 | 49 | 190 |
| 6 | 46 | 133 | 34 | 66 | 29 | 149 |
| 16 | 44 | 115 | 39 | 66 | 37 | 129 |
| 18 | 88 | 140 | 49 | 27 | 22 | 170 |
| 20 | 36 | 144 | 38 | 69 | 30 | 142 |
| 21 | 34 | 136 | 39 | 86 | 17 | 195 |
| 26 | 51 | 116 | 30 | 42 | 31 | 195 |
| 29 | 49 | 111 | 46 | 48 | 35 | 172 |
| 34 | 36 | 130 | 32 | 70 | 43 | 108 |
| 36 | 29 | 138 | 40 | 72 | 43 | 131 |
| 37 | 44 | 157 | 32 | 92 | 27 | 71 |
| 42 | 44 | 139 | 34 | 73 | 47 | 49 |
| 43 | 34 | 129 | 36 | 56 | 44 | 213 |
| 62 | 31 | 125 | 33 | 69 | 48 | 83 |
| 64 | 46 | 132 | 40 | 74 | 35 | 54 |
| 66 | 42 | 120 | 41 | 39 | 29 | 192 |
| 73 | 42 | 158 | 41 | 71 | 44 | 233 |
| 78 | 44 | 114 | 41 | 52 | 30 | 127 |
| 80 | 51 | 135 | 39 | 75 | 37 | 76 |
| 82 | 44 | 128 | 40 | 66 | 27 | 15 |
| 88 | 24 | 115 | 35 | 74 | 49 | 76 |
| 90 | 34 | 113 | 35 | 53 | 44 | 147 |
| 96 | 49 | 152 | 42 | 124 | 37 | 107 |
| 112 | 42 | 108 | 36 | 44 | 22 | 149 |
| Среднее | 41,85 | 129,5 | 37,35 | 67,12 | 37,58 | 136,38 |
| <i>CDM86as</i> | | | | | | |
| 7 | 35 | 137 | 44 | 60 | 46 | 168 |
| 12 | 44 | 127 | 33 | 105 | 21 | 93 |
| 19 | 74 | 130 | 40 | 37 | 24 | 3 |
| 24 | 69 | 131 | 46 | 20 | 16 | 45 |
| 27 | 66 | 149 | 37 | 49 | 42 | 146 |
| 32 | 62 | 130 | 43 | 24 | 12 | 48 |
| 40 | 44 | 134 | 35 | 43 | 34 | 252 |
| 41 | 44 | 147 | 42 | 52 | 41 | 208 |
| 48 | 39 | 134 | 47 | 34 | 26 | 173 |
| 50 | 44 | 132 | 37 | 40 | 30 | 216 |
| 55 | 78 | 104 | 38 | 18 | 13 | 169 |
| 59 | 57 | 140 | 44 | 37 | 25 | 153 |

| | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|---------|
| 60 | 109 | 104 | 40 | 40 | 3 | 7 |
| 63 | 275 | 146 | 72 | 14 | 5 | 136 |
| 67 | 225 | 120 | 64 | 7 | 25 | 117 |
| 71 | 38 | 97 | 38 | 33 | 25 | 152 |
| 77 | 44 | 143 | 46 | 51 | 39 | 203 |
| 92 | 63 | 132 | 45 | 77 | 62 | 78 |
| 93 | 38 | 117 | 32 | 46 | 36 | 193 |
| 94 | 168 | 153 | 72 | 31 | 19 | 110 |
| 100 | 50 | 150 | 42 | 46 | 36 | 201 |
| 101 | 53 | 126 | 38 | 47 | 37 | 177 |
| 111 | 53 | 132 | 39 | 53 | 41 | 95 |
| 113 | 57 | 113 | 41 | 145 | 2 | 76 |
| Среднее | 76,21 | 130,3 | 43,95 | 46,21 | 27,5 | 134,125 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 56 | 135 | 30 | 57 | 42 | 212 |
| 2 | 39 | 117 | 35 | 36 | 27 | 216 |
| 3 | 66 | 142 | 38 | 61 | 44 | 199 |
| 4 | 66 | 140 | 39 | 54 | 42 | 169 |
| 5 | 47 | 138 | 36 | 75 | 50 | 188 |
| 6 | 49 | 133 | 41 | 78 | 63 | 167 |
| 7 | 46 | 155 | 40 | 31 | 24 | 196 |
| 8 | 46 | 150 | 36 | 36 | 29 | 216 |
| 9 | 46 | 149 | 40 | 29 | 23 | 174 |
| Среднее | 51,2 | 139,8 | 37,2 | 50,7 | 38,2 | 193 |

Таблица 14 – Характеристики линий табака поколения T₀ со сверхэкспрессией CDM115

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. |
|----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|
| <i>CDM115s</i> | | | | | |
| 1 | 242 | 90 | 40 | 7 | 5 |
| 2 | 282 | 80 | 39 | 17 | 14 |
| 3 | 183 | 98 | 39 | 12 | 7 |
| 4 | 98 | 87 | 36 | 14 | 11 |
| 5 | 153 | 90 | 33 | 10 | 7 |
| 6 | 103 | 72 | 27 | 10 | 7 |
| 7 | 92 | 87 | 36 | 15 | 12 |
| 8 | 117 | 115 | 36 | 19 | 13 |
| 9 | 170 | 59 | 35 | 14 | 10 |
| 10 | 299 | 100 | 45 | 27 | 11 |
| 11 | 137 | 51 | 34 | 8 | 3 |
| 12 | 150 | 70 | 33 | 15 | 8 |
| 13 | 318 | 134 | 58 | 27 | 19 |
| 14 | 289 | 110 | 50 | 35 | 22 |
| 15 | 224 | 83 | 37 | 7 | 5 |
| 16 | 282 | 76 | 40 | 15 | 7 |
| 17 | 242 | 67 | 36 | 4 | 3 |
| 18 | 282 | 105 | 45 | 23 | 19 |
| 19 | 301 | 100 | 52 | 22 | 16 |
| 20 | 180 | 60 | 28 | 5 | 3 |
| 21 | 309 | 95 | 34 | 37 | 23 |
| 22 | 291 | 95 | 48 | 73 | 3 |
| 23 | 282 | 105 | 50 | 21 | 16 |
| 24 | 106 | 68 | 28 | 11 | 8 |
| 25 | 289 | 95 | 42 | 17 | 14 |
| 26 | 325 | 123 | 55 | 27 | 20 |
| Среднее | 221 | 89,04 | 39,85 | 18,9 | 11 |
| Контроль | | | | | |
| 1 | 75 | 120 | 38 | 51 | 38 |
| 2 | 70 | 120 | 32 | 42 | 32 |
| 3 | 80 | 120 | 36 | 44 | 36 |
| 4 | 75 | 120 | 39 | 48 | 36 |
| 5 | 70 | 120 | 35 | 40 | 33 |
| 6 | 75 | 100 | 33 | 20 | 16 |
| 7 | 75 | 110 | 37 | 29 | 24 |
| 8 | 75 | 120 | 34 | 54 | 37 |
| 9 | 97 | 80 | 31 | 13 | 10 |
| Среднее | 76,8 | 112,2 | 35 | 37,8 | 29,1 |

Таблица 15 – Характеристики линий табака поколения T₁

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|---------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>CDM86s</i> | | | | | | |
| T1 from # 88 | | | | | | |
| 2 | 67 | 88 | 34 | 11 | 1 | 101 |
| 3 | 60 | 77 | 35 | 13 | 4 | 102 |
| 75 | 180 | 125 | 45 | 12 | 4 | 80 |
| 106 | 36 | 95 | 34 | 33 | 14 | 74 |
| 109 | 36 | 110 | 32 | 37 | 19 | 63 |
| 117 | 36 | 110 | 40 | 46 | 17 | 113 |
| Среднее | 69,17 | 100,83 | 36,67 | 25,33 | 9,83 | 88,83 |
| T1 from # 43 | | | | | | |
| 1 | 65 | 117 | 41 | 17 | 12 | 179 |
| 2 | 39 | 100 | 37 | 23 | 17 | 199 |
| 3 | 42 | 117 | 38 | 25 | 18 | 160 |
| 4 | 63 | 114 | 39 | 15 | 11 | 198 |
| 5 | 131 | 94 | 35 | 9 | 7 | 143 |
| 6 | 45 | 86 | 30 | 17 | 10 | 45 |
| 7 | 49 | 114 | 40 | 11 | 8 | 151 |
| 8 | 65 | 83 | 34 | 16 | 10 | 68 |
| 9 | 59 | 87 | 33 | 9 | 6 | 162 |
| 10 | 66 | 112 | 35 | 16 | 12 | 179 |
| Среднее | 62,4 | 102,4 | 36,2 | 15,8 | 11,1 | 148,4 |
| T1 from # 3 | | | | | | |
| 1 | 45 | 106 | 33 | 26 | 14 | 137 |
| 2 | 59 | 96 | 33 | 16 | 7 | 167 |
| 3 | 60 | 92 | 35 | 24 | 4 | 128 |
| 4 | 59 | 106 | 33 | 24 | 7 | 164 |
| 5 | 51 | 83 | 34 | 19 | 4 | 87 |
| 6 | 45 | 80 | 31 | 15 | 5 | 157 |
| 7 | 64 | 74 | 32 | 15 | 2 | 39 |
| 8 | 64 | 98 | 38 | 15 | 6 | 90 |
| 9 | 45 | 80 | 30 | 13 | 9 | 131 |
| 10 | 64 | 77 | 33 | 13 | 7 | 144 |
| Среднее | 55,6 | 89,2 | 33,2 | 18 | 6,5 | 124,4 |
| T1 from # 36 | | | | | | |
| 1 | 63 | 98 | 43 | 23 | 11 | 83 |
| 2 | 53 | 100 | 42 | 13 | 2 | 145 |
| 3 | 65 | 81 | 35 | 8 | 4 | 47 |
| 4 | 173 | 94 | 39 | 15 | 2 | 46 |
| 5 | 46 | 81 | 34 | 18 | 10 | 28 |
| 6 | 51 | 64 | 29 | 12 | 6 | 29 |
| 7 | 44 | 90 | 38 | 27 | 6 | 46 |
| 8 | 65 | 72 | 33 | 9 | 3 | 67 |
| 9 | 60 | 82 | 35 | 14 | 3 | 71 |

| | | | | | | |
|---------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
| 10 | 197 | 128 | 51 | 16 | 3 | 42 |
| Среднее | 81,7 | 89 | 37,9 | 15,5 | 5 | 60,4 |
| T1 from # 6 | | | | | | |
| 2 | 33 | 126 | 58 | 29 | 6 | 131 |
| 6 | 37 | 109 | 40 | 49 | 9 | 132 |
| 12 | 36 | 119 | 36 | 55 | 16 | 130 |
| 23 | 113 | 138 | 46 | 25 | 6 | 35 |
| Среднее | 54,75 | 123 | 45 | 39,5 | 9,25 | 107 |
| Среднее по всем линиям | 64,72 | 100,89 | 37,79 | 22,83 | 8,34 | 105,81 |
| CDM115s | | | | | | |
| T1 from #4 | | | | | | |
| 26 | 35 | 125 | 46 | 40 | 27 | 118 |
| 10 | 266 | 120 | 55 | 9 | 7 | 111 |
| 142 | 37 | 117 | 40 | 35 | 23 | 116 |
| Среднее | 112,67 | 120,67 | 47 | 28 | 19 | 115 |
| T1 from #11 | | | | | | |
| 38 | 38 | 114 | 38 | 38 | 23 | 159 |
| 52 | 41 | 91 | 34 | 40 | 23 | 71 |
| 2 | 235 | 120 | 52 | 6 | 4 | 74 |
| Среднее | 104,67 | 108,3 | 41,3 | 28 | 16,67 | 101,3 |
| T1 from #22 | | | | | | |
| 14 | 335 | 150 | 79 | 48 | 1 | 19 |
| 171 | 43 | 109 | 29 | 40 | 29 | 85 |
| 181 | 34 | 102 | 41 | 20 | 14 | 186 |
| Среднее | 137,3 | 120,3 | 49,67 | 36 | 14,67 | 96,67 |
| T1 from #14 | | | | | | |
| 23 | 45 | 103 | 34 | 21 | 16 | 154 |
| 60 | 269 | 130 | 57 | 11 | 8 | 66 |
| 92 | 33 | 100 | 32 | 32 | 22 | 196 |
| Среднее | 115,67 | 111 | 41 | 21,3 | 15,3 | 138,67 |
| Среднее по всем линиям | 117,58 | 115,08 | 44,75 | 28,3 | 16,42 | 112,92 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 50 | 92 | 35 | 9 | 5 | 163 |
| 2 | 38 | 94 | 32 | 29 | 25 | 143 |
| 3 | 38 | 103 | 39 | 19 | 15 | 185 |
| 4 | 35 | 101 | 35 | 33 | 26 | 210 |
| 5 | 34 | 116 | 38 | 27 | 25 | 205 |
| 6 | 40 | 79 | 31 | 14 | 11 | 105 |
| 7 | 82 | 82 | 31 | 8 | 6 | 140 |
| Среднее | 45,28 | 95,28 | 34,43 | 19,86 | 16,14 | 164,43 |

Таблица 16 – Характеристики гибридных линий табака со сверхэкспрессией генов *CDM86* и *CDM115*

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|--------------------------------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Линия 1-1 (115-4-26 ♀ x 86-3-1 ♂) | | | | | | |
| 23 | 335 | 155 | 64 | 20 | 2 | 28 |
| 34 | 335 | 158 | 56 | 12 | 10 | 47 |
| 84 | 335 | 158 | 57 | 12 | 8 | 76 |
| 107 | 370 | 148 | 64 | 26 | 1 | 108 |
| 3 | 335 | 165 | 68 | 22 | 9 | 141 |
| 8 | 68 | 100 | 35 | 19 | 14 | 40 |
| 46 | 370 | 145 | 62 | 30 | 3 | 65 |
| 88 | 65 | 121 | 40 | 40 | 26 | 68 |
| 83 | 335 | 162 | 64 | 16 | 13 | 76 |
| Среднее | 283,1 | 145,78 | 56,67 | 21,89 | 9,5 | 72,1 |
| Линия 1-2 (115-4-26 ♂ x 86-3-1 ♀) | | | | | | |
| 1 | 82 | 110 | 37 | 15 | 11 | 150 |
| 2 | 292 | 190 | 65 | 12 | 11 | 123 |
| 3 | 77 | 108 | 39 | 12 | 10 | 124 |
| 4 | 67 | 108 | 36 | 21 | 15 | 197 |
| 5 | 73 | 113 | 40 | 30 | 2 | 36 |
| 6 | 46 | 101 | 34 | 28 | 19 | 120 |
| 7 | 88 | 105 | 43 | 30 | 3 | 8 |
| 8 | 335 | 168 | 62 | 22 | 8 | 40 |
| 10 | 73 | 118 | 40 | 17 | 14 | 157 |
| Среднее | 125,9 | 124,56 | 44 | 20,78 | 10,3 | 106,1 |
| Линия 2-1(115-11-52 ♀ x 86-88-117 ♂) | | | | | | |
| 25 | 357 | 176 | 68 | 7 | 3 | 42 |
| 80 | 80 | 101 | 38 | 14 | 5 | 86 |
| 39 | 320 | 155 | 65 | 11 | 7 | 46 |
| 20 | 320 | 170 | 75 | 10 | 6 | 68 |
| 1 | 143 | 94 | 46 | 8 | 6 | 29 |
| 90 | 95 | 83 | 41 | 12 | 6 | 29 |
| 3 | 80 | 99 | 38 | 14 | 5 | 18 |
| 4 | 94 | 100 | 39 | 9 | 6 | 38 |
| 5 | 320 | 167 | 75 | 10 | 4 | 29 |
| 6 | 112 | 90 | 43 | 8 | 4 | 10 |
| Среднее | 192,1 | 123,5 | 52,8 | 10,3 | 5,2 | 39,5 |
| Линия 3-1 (115-22-171 ♀ x 86-36-3 ♂) | | | | | | |
| 1 | 62 | 110 | 37 | 31 | 11 | 80 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|-------|------|------|------|-------|
| 2 | 315 | 139 | 60 | 14 | 6 | 92 |
| 3 | 315 | 155 | 60 | 11 | 7 | 144 |
| 4 | 315 | 152 | 60 | 12 | 9 | 133 |
| 5 | 72 | 111 | 31 | 19 | 12 | 67 |
| 6 | 60 | 104 | 34 | 26 | 21 | 41 |
| 7 | 60 | 110 | 32 | 30 | 24 | 100 |
| 8 | 52 | 110 | 30 | 76 | 2 | 20 |
| 9 | 62 | 113 | 27 | 47 | 1 | 5 |
| 10 | 315 | 150 | 60 | 14 | 5 | 116 |
| Среднее | 162,8 | 125,4 | 43,1 | 28 | 9,8 | 79,8 |
| Линия 2-2 (115-11-52 ♂ x 86-88-117 ♀) | | | | | | |
| 51 | 65 | 86 | 30 | 22 | 14 | 52 |
| 55 | 69 | 83 | 29 | 16 | 8 | 65 |
| 129 | 62 | 83 | 32 | 18 | 8 | 20 |
| 3 | 55 | 77 | 32 | 29 | 11 | 34 |
| 13 | 79 | 104 | 38 | 14 | 10 | 37 |
| 106 | 79 | 125 | 42 | 24 | 17 | 93 |
| 9 | 85 | 98 | 38 | 16 | 8 | 71 |
| 125 | 53 | 77 | 32 | 27 | 10 | 3 |
| 4 | 81 | 110 | 37 | 14 | 9 | 43 |
| 173 | 84 | 110 | 39 | 19 | 12 | 25 |
| Среднее | 71,2 | 95,3 | 34,9 | 19,9 | 10,7 | 44,3 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 60 | 123 | 41 | 15 | 11 | 160 |
| 2 | 55 | 139 | 41 | 30 | 24 | 130 |
| 3 | 55 | 147 | 41 | 27 | 16 | 142 |
| 4 | 106 | 128 | 48 | 24 | 19 | 191 |
| 5 | 60 | 134 | 42 | 27 | 23 | 171 |
| 6 | 55 | 122 | 41 | 17 | 13 | 183 |
| 7 | 55 | 130 | 41 | 17 | 13 | 178 |
| 8 | 55 | 123 | 41 | 17 | 13 | 140 |
| 9 | 60 | 136 | 43 | 25 | 21 | 83 |
| 10 | 100 | 134 | 46 | 29 | 20 | 205 |
| Среднее | 66,1 | 131,6 | 42,5 | 22,8 | 17,3 | 158,3 |

Таблица 17 – Характеристики растений табака поколения F₂ со сверхэкспрессией генов *CDM86*, *CDM115* и *CDM37*

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|---|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Линия 13-2 (2-2-13 (86x115) ♂ x 37-1-7-8-4 ♀) | | | | | | |
| 1 | 131 | 80 | 31 | 6 | 1 | 109 |
| 2 | 146 | 100 | 51 | 7 | 2 | 124 |
| 3 | 131 | 59 | 24 | 6 | 3 | 83 |
| 4 | 136 | 79 | 40 | 5 | 1 | 48 |
| 5 | 161 | 105 | 55 | 10 | 3 | 90 |
| 6 | 161 | 103 | 52 | 9 | 3 | 93 |
| 7 | 131 | 32 | 12 | 4 | 2 | 70 |
| 8 | 40 | 41 | 20 | 2 | 2 | 66 |
| 9 | 131 | 74 | 37 | 7 | 5 | 93 |
| 10 | 60 | 48 | 25 | 4 | 4 | 62 |
| Среднее | 122,8 | 72,1 | 34,7 | 6 | 2,6 | 83,8 |
| Линия 13-5 (37-1-7-8-4 ♀ x 2-2-13 (86x115) ♂) | | | | | | |
| 1 | 220 | 115 | 52 | 9 | 4 | 86 |
| 2 | 211 | 100 | 51 | 11 | 5 | 41 |
| 3 | 322 | 120 | 55 | 11 | 5 | 117 |
| 4 | 211 | 115 | 60 | 7 | 4 | 89 |
| 5 | 256 | 118 | 49 | 8 | 4 | 101 |
| 6 | 220 | 100 | 47 | 4 | 3 | 81 |
| 7 | 31 | 63 | 28 | 4 | 2 | 117 |
| 8 | 322 | 115 | 50 | 6 | 3 | 78 |
| 9 | 58 | 79 | 38 | 4 | 1 | 34 |
| 10 | 38 | 56 | 30 | 4 | 3 | 40 |
| Среднее | 188,9 | 98,1 | 46 | 6,8 | 3,4 | 78,4 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 60 | 123 | 41 | 15 | 11 | 160 |
| 2 | 55 | 139 | 41 | 30 | 24 | 130 |
| 3 | 55 | 147 | 41 | 27 | 16 | 142 |
| 4 | 106 | 128 | 48 | 24 | 19 | 191 |
| 5 | 60 | 134 | 42 | 27 | 23 | 171 |
| 6 | 55 | 122 | 41 | 17 | 13 | 183 |
| 7 | 55 | 130 | 41 | 17 | 13 | 178 |
| 8 | 55 | 123 | 41 | 17 | 13 | 140 |
| 9 | 60 | 136 | 43 | 25 | 21 | 83 |
| 10 | 100 | 134 | 46 | 29 | 20 | 205 |
| Среднее | 66,1 | 131,6 | 42,5 | 22,8 | 17,3 | 158,3 |

Таблица 18 – Характеристики исследуемых растений табака поколения F₃ со сверхэкспрессией генов *CDM86*, *CDM115* и *CDM37*

| № линии | Дни до цветения | Высота, см | Листья, шт. | Цветки, шт. | Коробочки, шт. | Вес семян, мг |
|--------------|-----------------|------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Линия 13-2-3 | | | | | | |
| 10 | 57 | 107 | 39 | 19 | 10 | 63 |
| 11 | 57 | 66 | 32 | 25 | 13 | 94 |
| 17 | 47 | 70 | 32 | 32 | 17 | 53 |
| 18 | 81 | 97 | 36 | 20 | 1 | 24 |
| Среднее | 56,6 | 81,5 | 33,16 | 25,3 | 9,6 | 63 |
| Линия 13-2-7 | | | | | | |
| 7 | 44 | 66 | 19 | 13 | 6 | 81 |
| 10 | 47 | 67 | 33 | 20 | 10 | 75 |
| 11 | 68 | 76 | 33 | 10 | 0 | 0 |
| 18 | 75 | 108 | 39 | 16 | 4 | 109 |
| 19 | 44 | 55 | 28 | 24 | 0 | 0 |
| 20 | 99 | 96 | 39 | 13 | 3 | 41 |
| Среднее | 67,1 | 81,45 | 32,36 | 17,72 | 5,72 | 56 |
| Контроль | | | | | | |
| 1 | 139 | 131 | 42 | 14 | 11 | 160 |
| 2 | 169 | 150 | 44 | 6 | 6 | 130 |
| 3 | 161 | 154 | 41 | 14 | 9 | 142 |
| 4 | 146 | 143 | 39 | 14 | 10 | 191 |
| 5 | 127 | 130 | 34 | 17 | 16 | 171 |
| 6 | 109 | 155 | 39 | 14 | 14 | 183 |
| 7 | 113 | 132 | 28 | 19 | 15 | 178 |
| 8 | 132 | 126 | 32 | 12 | 7 | 140 |
| 9 | 161 | 146 | 39 | 10 | 8 | 83 |
| Среднее | 139,67 | 140,78 | 37,56 | 13,33 | 10,67 | 153,11 |

Таблица 19 – Наличие консенсусов CArG-box в промоторе анализируемых генов *N. tabacum*, связанных с деградацией крахмала и биосинтезом каротиноидов

| Ген | NCBI ID | Локализация гена | Локализация промотора (1.5 кб) | Положение консенсуса CArG-box (CARGCW8GAT) |
|------------------|--------------|---|--------------------------------|--|
| <i>NtBAM1</i> | LOC107832261 | NW_015787824.1 (26358..29662) | 24858–26357 | 416, 1117 |
| <i>NtBAM9</i> | LOC107827956 | NW_015849100.1 (4074..7620, complement) | 7621–9121 | 1368 |
| | LOC107780374 | NW_015797716.1 (8065..13004) | 7565–8064 | 1556, 1771 |
| <i>NtGWD</i> | LOC107832610 | NW_015793074.1 (251..14125) | 0–251* | - |
| | LOC107775774 | NW_015901023.1 (87993..98472, complement) | 86493–87992 | 878, 1218 |
| <i>NtAI</i> | LOC107802234 | NW_015802778.1 (26868..31183) | 25368–26867 | 235, 383, 1710 |
| <i>NtPHO1-L1</i> | LOC107810306 | NW_015804840.1 (2762..12251, complement) | 12252–13751 | 246 |
| | LOC107814807 | NW_015809487.1 (94062..103594) | 92562–94061 | 232, 432 |
| <i>NtPSY2</i> | LOC107772713 | NW_015796120.1 (9958..12592) | 8458–9957 | - |
| | LOC107761716 | NW_015874368.1 (9940..13765) | 8440–9939 | - |
| <i>NtZDS</i> | LOC107772271 | NW_015892502.1 (11995..18341, complement) | 18342–19842 | 964 |
| <i>NtPDS</i> | LOC107816873 | NW_015814914.1 (652..8553) | 0–651* | 270, 418 |
| <i>NtCRTISO</i> | LOC107832559 | NW_015864184.1 (1937..8985, complement) | 8986–10485 | - |
| | LOC107791326 | NW_015919655.1 (47476..54454, complement) | 54455–55954 | 462, 1675 |
| <i>NtVDE</i> | LOC107780507 | NW_015797768.1 (65794..70434) | 64294–65793 | 1155, 1597 |
| | LOC107763628 | NW_015880850.1 (21643..26233) | 20143–21642 | 1272, 1625 |

* Доступные в NCBI геномные последовательности не позволяют идентифицировать участки промотора размером 1.5 кб