

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК**

На правах рукописи

Фадина Оксана Алексеевна

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНА *FRIGIDA* У ВИДОВ
*BRASSICA***

Специальность 03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

профессор, доктор биологических наук
Э.Е. Хавкин

Москва – 2014 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ (ВВЕДЕНИЕ).....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Экономическое значение культурных видов <i>Brassica</i>	14
1.2. Систематика культурных форм <i>Brassica</i>	17
1.2.1. Виды <i>Brassica</i> , составляющие треугольник U	17
1.2.2. Геномы <i>Brassica</i> A, B и C	21
1.3. Цветение растений как экономическая проблема	24
1.4. Генетические системы, регулирующие переход растений к цветению. 25	
1.4.1. Основные пути регуляции перехода к цветению	25
1.4.1.1. Фотопериодический путь	27
1.4.1.2. Вернализация.....	29
1.4.1.3. Регуляция цветения температурой внешней среды.....	31
1.4.1.4. Путь гиббереллина	32
1.4.1.5. Автономный путь	33
1.4.1.6. Некодирующие РНК	33
1.4.1.7. Взаимодействие генетических систем, регулирующих переход к цветению	35
1.5. Частные модели регуляции пути вернализации	36
1.6. Механизм вернализации на примере <i>A. thaliana</i>	39
1.6.1. Гены <i>FRIGIDA</i> и <i>FLOWERING LOCUS C</i>	39
1.6.2. Молекулярный механизм вернализации и эпигенетический контроль перехода к цветению.....	43

1.7. Белок FRIGIDA и его роль в процессе вернализации.....	48
1.8. Эколого-географические особенности вернализации у арабидопсиса ..	51
1.9. SCAR маркеры как инструмент для выявления полиморфизма, различения и идентификации геномов <i>Brassica</i>	57
1.10. Обзор патентов, связанных с практическим использованием генов развития.....	58
1.11. Заключение и постановка задач диссертационной работы	59
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1. Растительный материал	61
2.2. Методы исследования.....	61
2.2.1. Выделение геномной ДНК из тканей растений.....	61
2.2.2. Выделение плазмидной ДНК.....	61
2.2.3. Определение концентрации нуклеиновых кислот	61
2.2.4. Амплификация фрагментов геномной ДНК	61
2.2.5. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК	62
2.2.6. Клонирование амплифицированных фрагментов ДНК	63
2.3 Методы биоинформатики	64
2.4. Номенклатура маркеров.....	65
2.5. Регистрация последовательностей ДНК в базу данных GenBank NCBI	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	66
3.1. Поиск гомологов гена-прототипа <i>FRIGIDA A. thaliana</i> в генетических базах данных.....	66

3.2. Поиск и первичный анализ полноразмерных гомологов <i>FRIGIDA</i> из генома А с помощью методов <i>in silico</i>	66
3.3. Клонирование гомологичных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> из геномов А, С и В <i>Brassica</i>	70
3.3.1. Создание и верификация локус-специфичных праймеров для клонирования <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> из геномов А и С <i>Brassica</i>	70
3.3.2. Клонирование полноразмерных последовательностей локусов <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> из геномов А и С <i>Brassica</i>	72
3.3.3. Создание и верификация ген-специфичных праймеров для амплификации консервативного участка гена <i>FRIGIDA</i> из генома В <i>Brassica</i>	74
3.3.4. Клонирование консервативного участка гена <i>FRIGIDA</i> из В генома <i>Brassica</i>	75
3.4. Клонирование гомологичных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> из субгеномов А, С и В <i>Brassica</i>	76
3.5. Строение нуклеотидных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> в геномах и субгеномах <i>Brassica</i>	78
3.5.1. Экзон-интронная структура клонированных нами нуклеотидных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> <i>Brassica</i>	78
3.5.2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> <i>Brassica</i>	78
3.6. Анализ последовательностей белков <i>FRIGIDA.a</i> и <i>FRIGIDA.b</i> у видов <i>Brassica</i>	84
3.7. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> <i>Brassica</i>	90
3.8. Локусы <i>FRIGIDA</i> у фенотипически контрастных форм <i>Brassica</i>	90

3.9. SCAR маркеры, сконструированные на основе полиморфизмов гена <i>FRIGIDA</i>	92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	98
4.1. Полиморфизм гена <i>FRIGIDA</i> в семействе Brassicaceae.....	98
4.2. Строение белка <i>FRIGIDA</i> у <i>Brassica</i>	103
4.3. Возникновение двух локусов гена <i>FRIGIDA</i> в семействе Brassicaceae в контексте эволюции геномов <i>Arabidopsis</i> и линий <i>Brassica</i>	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ.....	118
БИБЛИОГРАФИЯ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BRAD (Brassica database) –база данных, содержащая генетическую информацию о геномах культурных видов *Brassica*

CBC (nuclear cap-binding complex) - кэп-связывающий комплекс

Coiled-coil domain – домен белка, обладающий суперспиральной структурой

DMRs (differentially methylated regions) - дифференциально метилированных регионов)

dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate) – дезоксинуклеозидтрифосфат

EST (expressed sequence tag sequences) - экспрессирующиеся маркерные последовательности

FM (floral meristem) - флоральная меристема

GSS (genome survey sequences) – последовательности, полученные при секвенировании геномов

GWA (genome wide association) - метод картирования полных геномов

InDel (insertion/deletion) – инсерция/делеция

IPTG – ИПТГ, изопропил-β-D-тиогалактозид

LB – питательная среда Лурия-Бертани

LncRNA (long noncoding RNA) – длинная некодирующая РНК

miRNA (microRNA) - микроРНК

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

Pfu -ДНК полимераза – термостабильная ДНК-полимераза из *Pyrococcus furiosus*

QTL (quantitative trait locus) - локус количественного признака

SAM (shoot apical meristem) – апикальная меристема побега

SCAR (от sequence characterized amplified region) – охарактеризованная последовательность амплифицированного участка ДНК.

SNP (single nucleotide polymorphism) - мононуклеотидный полиморфизм

SRA - high-throughput DNA and RNA sequence read archive – архив последовательностей ДНК и РНК высокого разрешения

ТАЕ-буфер - трис-ацетатный буфер

Taq-ДНК полимераза - термостабильная ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus*

UTR (untranslated regions) - нетранслируемые участки

X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид

а.о. – аминокислотный остаток

ДД – длинный день

ИПТГ - изопропил-в-тиогалактозид

КД – короткий день

КО – кодирующая область

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Наиболее часто употребляемые сокращения названий генов:

AG – AGAMOUS

AGL24 – AGAMOUS-LIKE24

API - APETALA1

CO - CONSTANS

FES1 - FRIGIDA ESSENTIAL1

FLC - FLOWERING LOCUS C

FLX - FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR

FRI – FRIGIDA

FRL1 - FRIGIDA-LIKE 1

FT - FLOWERING LOCUS T

Hd1- HEADING DATE1

Hd3 - HEADING DATE3

LFY - LEAFY

SOC1 - SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1

SUF4 - SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4

SVP – SHORT VEGETATIVE PHASE

TFL1 - TERMINAL FLOWERING 1

VIN3 - VERNALIZATION INSENSITIVE 3

VRN1 – VERNALIZATION1

VRN2 – VERNALIZATION2

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ (ВВЕДЕНИЕ)

Важным этапом жизненного цикла растений является переход от вегетативного к репродуктивному развитию, который запускается и контролируется различными эндогенными и экзогенными сигналами. В умеренных широтах в ходе эволюции в результате длительного воздействия изменяющихся условий внешней среды формировались экологические особенности конкретных видов растений, и тем самым увеличивалось их разнообразие. Повторяющаяся смена ледниковых и межледниковых эпох оказала сильное влияние на растительность: с наступлением ледниковых эпох теплолюбивые виды растений отступали к югу, в межледниковые эпохи они вновь возвращались на север. Изменялись рельефы поверхности Земли, состав почв, температура, влажность, продолжительность дня и ночи и освещенность. В результате одни типы растительности сменялись другими. Каждый раз, с изменением окружающей среды, растения приспосабливались к определенной экологической нише, вырабатывая определенные требования к условиям существования. Поэтому в каждой из природных зон (тундра, тайга, степь, пустыня) закрепились те жизненные формы растений, которые наилучшим образом приспособлены к конкретным условиям произрастания. В частности, в процессе эволюции, посредством изменчивости, наследственности и адаптации, возникли растения, различные по периодичности цветения: однолетние, двулетние, многолетние, монокарпики - и времени зацветания: ранне- и поздноцветущие формы.

Возможность возделывать ранне- и поздноцветущие формы культурных растений раздвигает границы полевого сезона, а в ряде случаев, обеспечивает круглогодичное получение хозяйственного урожая. Способность одних растений зацветать раньше, а других - позже регулируется сложным генетическим механизмом. На примере арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) создана подробная модель генетической

регуляции перехода к цветению, которая хорошо объясняет особенности этого процесса у многих групп однолетних растений.

Ключевым геном этой модели является *FLOWERING LOCUS T*, продукт экспрессии которого входит в состав предсказанного М.Х. Чайлахяном флоригена - мобильного сигнала, необходимого для индукции цветения (Аксенова и др., 2006; Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007; Turk et al., 2008). На экспрессию *FLOWERING LOCUS T* влияют различные факторы внешней и внутренней среды (продолжительность освещения и качество света, температура, гормональный статус, углеводное питание и др.), поэтому при анализе генетической регуляции экспрессии *FLOWERING LOCUS T* выделяют несколько механизмов индукции цветения: фотопериодический путь, путь гиббереллина, автономный путь, реакцию на температуру окружающей среды, включая путь вернализации, и др. Эти пути взаимодействуют между собой, и их относительный вклад изменяется в различных экологических условиях и у разных жизненных форм растений. Эта модель (Бернье и др., 1985; Amasino, 2004; Bernier and Perilleux, 2005) постоянно дополняется и усложняется по мере появления новой информации о генах, контролирующих ключевые гены каждого пути, включая гены эпигенетического контроля, и об участии miRNA в молекулярном механизме перехода к цветению (Adrian et al., 2009; Andres and Coupland, 2012; Kim et al., 2009; Moghaddam and Van den Ende, 2013; Rataj and Simpson, 2014; Song et al., 2012; Yamaguchi and Abe, 2012).

Изучение генов, регулирующих переход к цветению, может быть полезным при создании новых инструментов для селекции культурных растений на раннеспелость и продолжительность вегетационного периода. Одним из важных направлений селекционных работ является создание высокоурожайных сортов и гибридов, обеспечивающих круглогодичное получение сельскохозяйственной продукции. Другими экономическими характеристиками продуктивных форм культурных растений являются одновременное достижение хозяйственной спелости и морфологическая

выравненность посева, необходимые для механизации их возделывания. Изучение генов, стоящих за этими признаками, также имеет большое практическое значение.

Процесс первичного одомашнивания растений и современная селекция используют полиморфизмы генов перехода к цветению и регулирующих их генов, которые, при генетическом анализе популяций, обнаруживаются как QTLs основных хозяйственных признаков. Особенно плодотворными оказались исследования, в которых результаты QTL анализа высокого разрешения совмещены с физическим картированием и клонированием генов перехода к цветению у культурных растений и их дикорастущих сородичей. Сравнительный исторический, экологический и эволюционный анализ природной и искусственно созданной изменчивости признаков, связанных со временем перехода к цветению и скороспелостью, позволяет не только прояснить роль этих признаков в одомашнивании и адаптации культурных растений в различных экологических зонах и разнообразных агроценозах, но и выявить гены, которые могут быть точкой приложения молекулярной селекции на основе традиционных методов гибридизации и отбора и с использованием методов геномной инженерии (Alonso-Blanco et al., 2009; Blackman et al., 2011; Doebley et al., 2006; Ehrenreich et al., 2009; Izawa, 2007; Olsen and Wendel, 2013).

В качестве масличных, овощных и технических культур растения рода *Brassica* L. занимают важное место в сельскохозяйственном производстве, в том числе в нашей стране. Растения *Brassica* представлены яровыми и озимыми однолетними и двулетними жизненными формами, происходящими из субтропиков и умеренных широт. Эти формы сильно различаются по времени зацветания. Шесть культурных видов *Brassica* образуют классический треугольник U (Nagaharu, 1935) из диплоидных видов с геномами А, В и С: *Brassica rapa* L. (геном А), *Brassica nigra* (L.) W. D.J.Koch (геном В), *Brassica oleracea* L. (геном С) и амфиплоидов *Brassica juncea* (L.)

Czern. (геном АВ), *Brassica napus* L. (геном АС) и *Brassica carinata* A.Braun (геном ВС).

Для климатических условий нашей страны особенно важна регуляция времени зацветания однолетних культурных растений *Brassica* под влиянием длительного воздействия низких положительных температур (путь вернализации). Этот путь наиболее подробно исследован на растениях арабидопсиса, близкого родственника растений *Brassica*. Ключевыми элементами этого пути у арабидопсиса являются гены *FLOWERING LOCUS C* и *FRIGIDA* (Johanson et al., 2000; Shindo et al., 2005); аллельное разнообразие и плейотропия этих генов во многом определяют адаптационный потенциал растений арабидопсиса в различных экологических условиях (Lovell et al., 2013; Strange et al., 2011).

У растений *Brassica* ген *FLOWERING LOCUS C* исследован достаточно подробно (см. Zou et al., 2012); напротив, ген *FRIGIDA* у растений *Brassica* к началу нашей работы оставался практически неизученным. Наше исследование строения гена *FRIGIDA* в геномах *Brassica* было призвано хотя бы отчасти восполнить этот пробел. За время нашего исследования появились публикации, подробно описывающие структурные и функциональные особенности гена *FRIGIDA* у *B. napus* (Wang et al., 2011) и *B. oleracea* (Irwin et al., 2012). Детально изученная эволюция геномов *Brassica* (Cheung et al., 2009; Couvreur et al., 2010; Lysak et al., 2005; Schranz et al., 2006) создает благоприятные предпосылки для анализа дивергенции *FRIGIDA* в связи с особенностями перехода к цветению у жизненных форм *Brassica*.

Цель и задачи исследования. Провести *in silico* анализ гомологов гена *FRIGIDA* *A. thaliana* среди культурных видов *Brassica*. Клонировать и провести сравнительный анализ строения гена *FRIGIDA* в геномах и субгеномах А, В и С культурных видов *Brassica*. Выявить локус- и геном-специфичные полиморфизмы гена *FRIGIDA*. Создать на этой основе специфичные SCAR маркеры, пригодные для использования в

интрогрессивной селекции, для картирования и функционального анализа гена *FRIGIDA*.

Научная новизна исследования. Обоснована двухлокусная модель гена *FRIGIDA* у растений рода *Brassica*. Получены новые данные о структурных особенностях двух локусов *FRIGIDA* в геномах А, В и С и дивергенции гена *FRIGIDA* у растений рода *Brassica*. Создана система SCAR маркеров для изучения разнообразия двух локусов *FRIGIDA* в геномах и субгеномах *Brassica*; эти маркеры могут быть использованы для картирования и функционального анализа гена *FRIGIDA*.

Практическая значимость работы. Созданы локус- и геном-специфичные маркеры гена *FRIGIDA*, которые могут оказаться полезными для уточнения связи этого гена с QTL времени перехода к цветению. Эти маркеры могут также быть использованы в интрогрессивной селекции культурных форм *Brassica*, в том числе на время зацветания и скороспелость.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Экономическое значение культурных видов *Brassica*

Среди культурных растений рода *Brassica* особое место занимают шесть видов: *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. juncea* и *B. carinata*. Разнообразные формы этих видов возделываются как овощные, кормовые, масличные и декоративные культуры (Жуковский, 1971; Branca and Cartea, 2011).

Вид *Brassica rapa* L. включает экономически важные масличные, овощные и кормовые, листовые и корнеплодные культуры и широко распространен на земном шаре. К листовым культурам относятся всевозможные виды китайской (*B. rapa* subsp. *chinensis*) и пекинской (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) капусты, возделываемых в Китае и Японии еще с древних времен. В Восточной Азии листовая капуста занимает первое место по посевной площади и считается основной овощной культурой. Она характеризуется высоким содержанием каротина, разнообразных витаминов (В1, В2, В6, В9, С, Е, К, РР) и селена, которые являются активными природными антиоксидантами и важными элементами защитных и адаптивных систем живого организма. Турнепс и репа представляют корнеплодные культуры *B. rapa*, которые употребляются в пищу и на корм скоту. Наибольшие площади возделывания турнепса находятся в Германии, Дании, Великобритании, США, Канаде, Австралии. Репа очень богата витаминами и минеральными солями. В России репу издавна сеют по всей стране.

Вид *B. oleracea* L. представлен такими разнообразными формами, как кормовая капуста кале (kale), капуста кочанная (cabbage), капуста цветная (cauliflower), брокколи (broccoli), брюссельская капуста (Brussel sprouts), кольраби (kohlrabi). Эти растения богаты важными питательными веществами, которые сохраняются в листьях при длительном хранении, что особенно важно для стран с продолжительной зимой. Капуста кочанная,

основное овощное растение во всех странах умеренных широт, культивируется в России и занимает примерно 30% площади, отведенной под овощные культуры. Цветная капуста широко возделывается во всей Европе, в Северной и Южной Америке, в Китае и Японии. По масштабам культуры занимает второе место после белокочанной капусты. Площадь под этим видом в СНГ составляет около 0,8—1 % посевов капусты. В Германии на долю цветной капусты приходится 10 % площади, занимаемой овощными растениями. Брюссельскую капусту широко культивируют в странах Западной Европы, США и Канаде, в России ее возделывают в ограниченном количестве, в основном в центральных районах Европейской части страны. Капуста кале употребляется в пищу, а также в качестве кормовой культуры и в декоративных целях. Кольраби является ценным диетическим продуктом, ее мякоть богата глюкозой, фруктозой, соединениями серы, солями калия, витаминами В1, В2, С и РР. Она популярна во многих странах Европы, в Америке и Канаде. В России, благодаря ее холодостойкости, кольраби выращивают на Сахалине и Камчатке.

Растения рапса (*B. napus*) используются для получения пищевого растительного масла (масличный рапс) и в качестве кормовой культуры (брюква). Рапсовое масло используют, как и другие масла, в приготовлении блюд, для приготовления маргарина, в металлургической, мыловаренной, кожевенной и текстильной промышленности. Рапсовый шрот используется в животноводстве как пищевая основа для различных комбикормов и премиксов. В связи с ростом цен на ископаемое топливо возникла новая важная область использования масличного рапса для производства биодизельного топлива, неистощаемого источника энергии взамен ископаемых энергоресурсов. Масло из семян используют в качестве добавки в традиционное дизельное топливо в промышленных масштабах (Jeong and Park, 2006). Рапс возделывают в Канаде, Индии, Китае, и других странах. Основные районы возделывания озимого рапса в СНГ — лесостепная зона Украины, ярового рапса — северная часть лесостепной зоны Украины. Для

кормовых целей озимый рапс можно выращивать почти во всех районах степи, лесостепи и лесолуговой зоны России и стран СНГ. В России, в связи с погодными условиями, в основном возделывается яровой рапс. Озимый рапс распространён на юге, в Ставропольском и Краснодарском крае.

Виды *Brassica*, содержащие геном В, представлены тремя горчицами – сарептской, черной и индийской (соответственно, *B. juncea*, *B. nigra* и *B. carinata*). Все три вида горчиц выращиваются для получения масла, специй и салатных листьев. Горчица сарептская (*B. juncea*) является одной из важнейших масличных культур. Она является хорошим медоносом. Масло горчицы используют в кулинарии, хлебопекарной, кондитерской, консервной, мыловаренной, текстильной, фармацевтической и парфюмерной промышленности, а также как техническое. Обезжиренный жмых семян используют для приготовления столовой горчицы, а порошок из размолотых семян горчицы применяют как приправу и ароматизатор. В Китае листья этой горчицы в сыром виде употребляют в пищу. Культивируется она в Индии, Китае, Индокитае, Малой Азии, Северной Африке, в странах Европы. В России горчица, по большей части, культивируется в Волгоградской, Саратовской, Ростовской областях, Ставропольском крае и Западной Сибири. Масло черной горчицы (*B. nigra*) идёт для пищевых и технических целей, а обезжиренные семена используют на изготовление лучших сортов столовой горчицы и в медицине для производства горчичников. Как масличная культура индийская горчица (*B. carinata*) значительно превосходит рапс (*B. napus*) в способности адаптироваться и давать большие урожаи при таких неблагоприятных условиях окружающей среды, как высокие температуры и засуха. Большинство сортов *B. carinata* имеют низкую питательную ценность из-за высокого содержания глюкозинолатов (синигрин) и эруковой кислоты (Getinet et al., 1996). Благодаря приспособленности *B. carinata* к засушливым условиям климата Средиземноморья получаемое из нее масло становится выгодной альтернативой рапсовому маслу для производства биодизельного топлива в странах этого региона (Cardone et al., 2003). Виды *Brassica*,

содержащие геном В, используют в качестве донора генов устойчивости к черной ножке при создании новых сортов рапса с долговременной устойчивостью к этой болезни (Chévre et al., 2008).

1.2. Систематика культурных форм *Brassica*

1.2.1. Виды *Brassica*, составляющие треугольник U

Brassica, один из 51 рода трибы Brassiceae, принадлежащих к семейству Brassicaceae (капустных/крестоцветных), является одним из наиболее экономически важных родов этой трибы. Культурные виды *Brassica* L. включают яровые и озимые однолетние и двулетние жизненные формы, происходящие из субтропиков и умеренных широт и представленные диплоидными и тетраплоидными видами с геномами А, В и С: *Brassica rapa* L. (геном А), *Brassica nigra* (L.) W. D.J.Koch (геном В), *Brassica oleracea* L. (геном С), *Brassica juncea* (L.) Czern. (геном АВ), *B. napus* L. (геном АС) и *Brassica carinata* A.Braun (геном ВС). Цитогенетические взаимоотношения между различными видами *Brassica* представлены треугольником U (Nagaharu, 1935). Этот треугольник (рис. 1А) включает шесть наиболее распространенных культурных видов *Brassica*: три диплоида (*B. rapa*, *B. oleracea* и *B. nigra*) и три аллотетраплоида (*B. napus*, *B. juncea* и *B. carinata*). Аллотетраплоидные виды произошли в результате гибридизации диплоидных видов *Brassica*. В процессе одомашнивания каждого вида дивергентный отбор обогащал разнообразие сортов и культур (Rakow, 2004).

***Brassica nigra* (L.) Koch** (n = 8), черная горчица. Растения *B. nigra* не нуждаются в вернализации для индукции цветения. Вид возник в Средиземноморье, и представители диких форм *B. nigra* распространены по всей Северной Африке, а также найдены в Эфиопии и Эритрее. Как сельскохозяйственная культура черная горчица возделывалась на Родосе, Крите, Сицилии, Турции и Эфиопии.

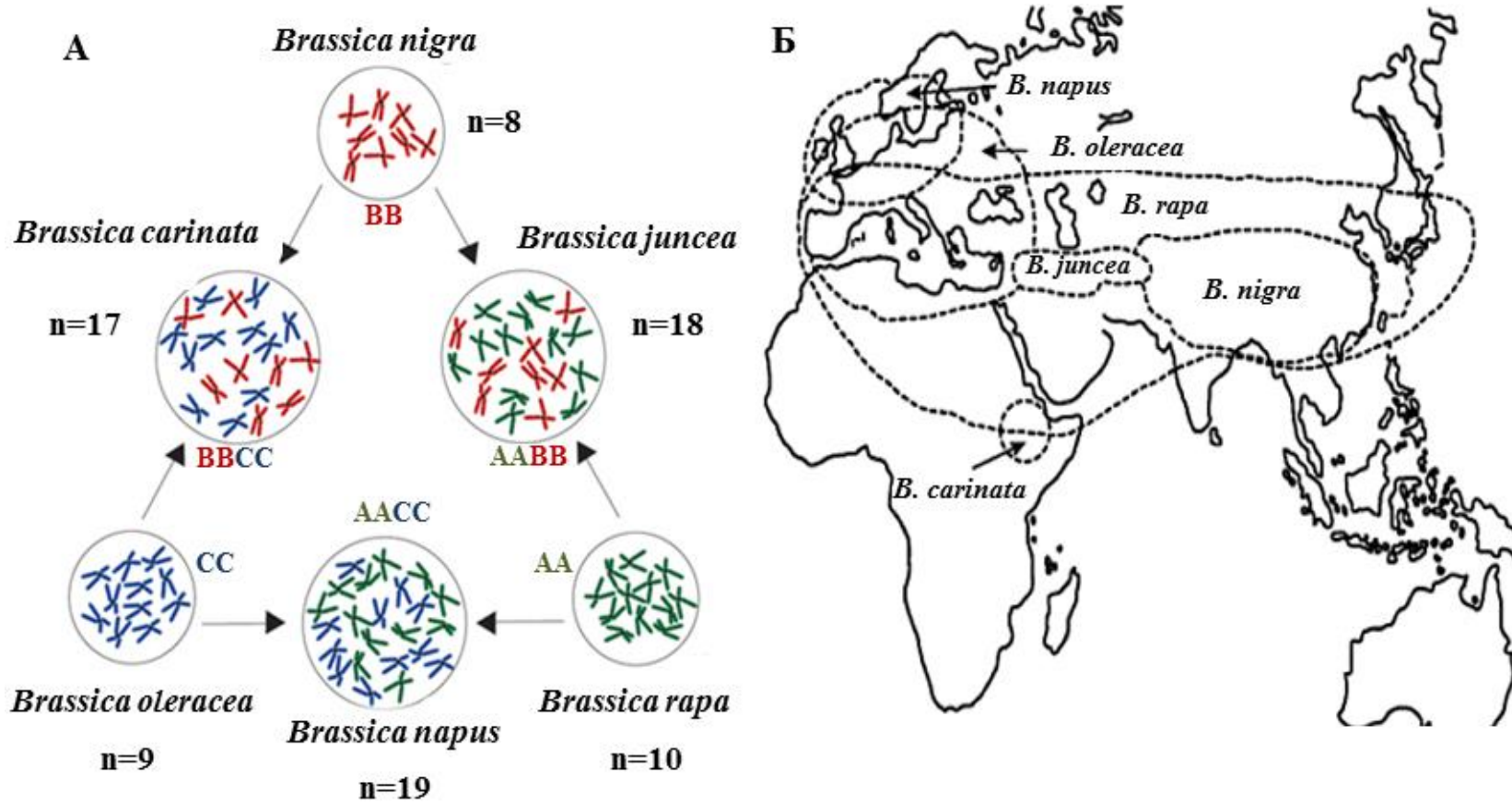


Рис. 1. Виды *Brassica*, составляющие треугольник U. (А) Треугольник U (Nagaharu, 1935). Диплоидные виды *B. rapa* ($2n=20$, геном AA), *B. nigra* ($2n=16$, геном BB) и *B. oleracea* ($2n=18$, геном CC) и тетраплоидные аллополиплоиды *B. napus* ($2n=38$, *B. rapa* x *B. oleracea*, геном AACC), *B. juncea* ($2n=36$, *B. rapa* x *B. nigra*, геном AABB) и *B. carinata* ($2n=34$, *B. nigra* x *B. oleracea*, геном BBCC). n – число хромосом одного гаплоидного генома. (Б) Географическое распространение и возможные ареалы происхождения видов *Brassica* (Dixon, 2007, с изм.).

В настоящее время возделывается в небольших количествах в Англии, Франции, Италии, Румынии, Индии, Турции и Китае.

***Brassica oleracea* L.** (n = 9). Дикие виды были найдены на небольших изолированных территориях и сформировали очень разные фенотипы. *B. oleracea* была найдена на побережье северной Испании, западной Франции и южной и юго-западной Англии. Культурные формы *B. oleracea* представлены семью группами, которые произошли от исходного фенотипа западноевропейской дикой *B. oleracea* под действием мутаций, адаптаций и искусственного отбора: *B. oleracea* Acephala Group - капуста кормовая Кале (Kale и collard greens) (var. *acephala*); *B. oleracea* Capitata Group - кочанная капуста (Cabbage) (var. *capitata*, var. *sabauda*, var. *bullata*), *B. oleracea* Gongylodes Group - кольраби (Kohlrabi) (var. *gongylodes*); *B. oleracea* Botrytis Group - цветная капуста (Cauliflower Romanesco, broccoli и broccoflower) (var. *botrytis*); *B. oleracea* Gemmifera Group - брюссельская капуста (Brussel sprout) (var. *gemmifera*); *B. oleracea* Alboglabra Group - брокколи (Chinese broccoli) (*B. alboglabra*); *B. oleracea* Italica Group – брокколи (Broccoli) (var. *italica*).

***Brassica rapa* L.** (синоним *B. campestris* L., n = 10) представлена разнообразными формами, которые можно разделить на три группы: масличные, листовые и корнеплодные. *B. rapa* произошла от дикого вида *B. rapa* ssp. *sylvestris*, который встречается в горной местности недалеко от Средиземного моря. Отсюда она распространилась по всей Европе. Считается, что *B. rapa* ввезена в Китай через Западную Азию и Монголию в качестве сельскохозяйственной культуры. В Японию, вероятно, этот вид попал из Китая и Сибири. Известно, что *B. rapa* культивировалась в качестве масличной культуры в Индии, но дикие формы этого вида там не обнаружены. Масличные культуры этого вида также, возделываются в Швеции, Финляндии и Канаде. Известны семь овощных культур *B. rapa*: var. *campestris*, var. *pekinensis*, var. *chinensis*, var. *parachinensis*, var. *narinosa*, var. *japonica* и var. *rapa*. Капуста пекинская (var. *pekinensis*) возникла в Северном

Китае и похожа на масличную культуру *B. rapa*, произрастающую в Китае. Она приспособлена к несколько более прохладному климату. Капуста китайская (var. *chinensis*) является листовой культурой и отличается от масличного типа *B. rapa* в Китае; var. *parachinensis* - производная от var. *Chinensis*. *B. rapa* var. *narinosa* устойчива к холоду и предъявляет те же требования к условиям роста, что и var. *chinensis*. *B. rapa* var. *japonica* - это вид листовой капусты, произрастающей в Японии. *B. rapa* var. *rapa* (репа) культивируется во всем мире как корнеплодный овощ и в качестве корма для животных.

***Brassica carinata* A. Braun** (n = 17) - это амфиплоидный вид, возникший в результате межвидовой гибридизации *B. nigra* (n = 8) и *B. oleracea* (n = 9). Нет никаких сведений о существовании диких видов *B. carinata*. Этот вид возник в высокогорьях Эфиопии, где по преимуществу возделывается в качестве масличной и овощной культуры. Как масличная культура *B. carinata* значительно превосходит *B. napus* по способности адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды и давать большие урожаи в засушливом климате.

***Brassica juncea* (L.) Czern & Coss** (n = 18) - амфиплоидный вид, произошедший в результате межвидовой гибридизации *B. nigra* (n = 9) и *B. rapa* (n = 10). Дикая форма *B. juncea* были найдены на Ближнем Востоке и в южной части Ирана. Этот вид выращивается в Индии в качестве масличной культуры (коричневая, или индийская горчица). В Китае в пищу используют листья и корнеплоды (*B. juncea* var. *napiformis*). Однако Китай не рассматривается, как место происхождения этого вида, так как дикие виды *B. nigra* и *B. rapa* в этой стране не были обнаружены.

***Brassica napus* L.** (n = 19) представляет собой амфиплоидный вид, возникший в результате межвидовой гибридизации *B. oleracea* (n = 9) и *B. rapa* (n = 10). Дикая форма *B. napus* найдены в Швеции, Нидерландах и Великобритании. Считается, что вид *B. napus* появился на побережье Северной Европы, где произрастали дикорастущие виды *B. oleracea* и *B.*

rapa. Другие исследователи считают, что *B. napus* возник в Средиземноморье или на западе Европы. Вполне вероятно, что формы *B. napus* могли образоваться независимо в разных местах в результате скрещивания различных форм *B. oleracea*, и *B. rapa*. Существуют озимые и яровые масличные культуры *B. napus*, которые выращивают во многих странах мира.

1.2.2. Геномы *Brassica* A, B и C

Выдающиеся успехи в области геномики и молекулярной цитогенетики позволили составить достаточно определенную картину происхождения видов *Brassica* (см. Navabi et al. , 2013; Schranz et al., 2006; Schranz et al., 2007). Диплоидные виды *B. rapa*, *B. nigra* и *B. oleracea*, по всей видимости, произошли от общего гексаплоидного предка Brassicaceae ($2n=6x=24$), который в ходе эволюции несколько раз подвергся полиплоидизации и транслокации хромосом (рис. 2). Линии *Brassica* и *Arabidopsis* разошлись в интервале между 14,5 и 20 миллионами лет назад (Cheng et al., 2013; Cheung et al., 2009; Couvreur et al., 2010; Lysak et al. 2005). Считается, что линия B дивергировала около 7.9 - 14.6 миллионов лет назад (Lysak et al. 2005). Однако недавний сравнительный анализ трех генов *Brassica* позволил более точно определить время дивергенции этих двух линий, около $6.2(\pm 2.19)$ миллионов лет назад (Navabi et al., 2013). Разделение генома A и генома C предположительно произошло около 3,7 миллионов лет назад (Lysak et al. 2005).

Теория происхождения современных видов *Brassica* от общего гексаплоидного предка поддерживается цитогенетическими и молекулярными исследованиями Robbelen (1960) и Truco (1996). Показано наличие шести основных типов хромосом (ABCDEF) у диплоидных видов *Brassica* и происхождение их от шести предковых хромосом (W1-W6), которые подвергались нескольким дупликациям и перестройкам в процессах видообразования (рис. 3).

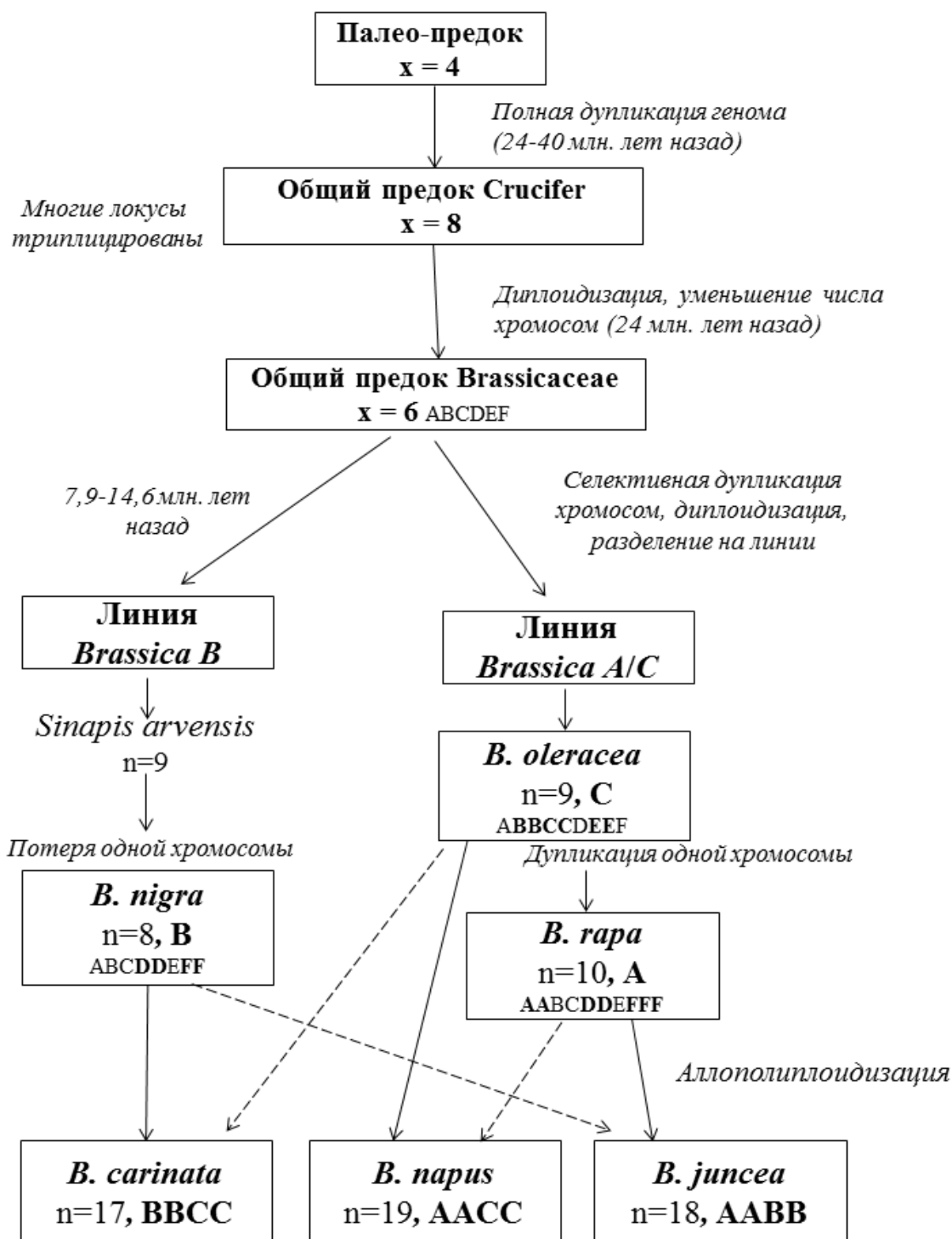


Рис. 2. Предполагаемая модель происхождения видов *Brassica*. x – число хромосом, n – число хромосом одного гаплоидного генома вида *Brassica*, **ABCDEF** – шесть основных типов хромосом. Сплошной и пунктирной линиями показаны, соответственно, женская и мужская родительские формы (Prakash et al., 2009, с изм.).

Каждый диплоидный вид *Brassica* содержит все шесть типов хромосом, но некоторые хромосомы дублированы или триплицированы, что привело к различному количеству хромосом в геномах диплоидных *Brassica*. Так, у *B. rapa* произошла дубликация хромосом А и D и трипликация хромосомы F (n=10 AABCDDEFFF), у *B. oleracea* дублировались хромосомы В, С и Е (n=9, ABBCDDEEF), у *B. nigra* были дублированы хромосомы D и F (n=8, ABCDDEFF). С учетом этих различий, геномы видов *B. rapa*, *B. nigra* и *B. oleracea* обозначают соответственно как А, В и С. Геномы А и С являются близкородственными, тогда как геном В в большей степени отличается от геномов А и С (Prakash et al., 2009).

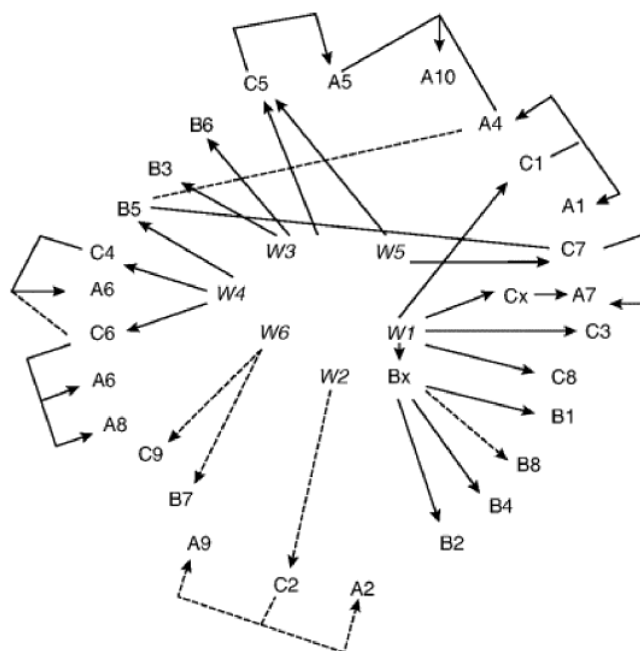


Рис. 3 Предполагаемая модель эволюции хромосом современных геномов А, В и С *Brassica*. W1-W6 – основные типы предковых хромосом; Вх и Сх – промежуточные хромосомы, давшие начало некоторым хромосомам современных геномов В и А *Brassica*; C1 – C9 - хромосомы генома С, давшие начало образованию хромосом генома А; А1 - А10 – хромосомы генома А; В1 -В8 - хромосомы генома В. Пунктирной линией обозначены предполагаемые гомологи (Truco et al., 1996).

В дополнение к цитогенетическим исследованиям, предположение о роли трипликации в происхождении диплоидных геномов *Brassica* подтверждается исследованиями по сравнительному картированию

гомологичных регионов хромосом *A. thaliana* в культурных видах *Brassica*, показана высокая коллинеарность ортологичных областей этих геномов (Navabi et al., 2013; Panjabi et al., 2008; Parkin et al., 2002; Parkin et al., 2005; Schranz et al., 2006; Schranz et al., 2007). Сравнительный анализ сегментной организации геномов подтвердил различие между геномом *B. nigra* и близкородственными геномами Rapa/Oleracea. Важным отличием генома В от геномов линии А/С является наличие одной крупной хромосомной перестройки, которая могла сделать невозможной рекомбинацию между геномами этих линий (Navabi et al., 2013).

В ходе эволюции диплоидные виды *Brassica* развивались независимо, поэтому в их геномах происходили различные качественные и количественные изменения, приводящие к накоплению и сочетанию предпочтительных аллелей генов, обеспечивающих выживание в ходе естественного отбора и формирование хозяйственно ценных признаков в ходе искусственного отбора.

1.3. Цветение растений как экономическая проблема

Сдвиг сроков цветения является важной задачей селекции растений с целью получения новых сортов, которые лучше приспособлены к местным условиям возделывания и изменяющимся условиям окружающей среды, включая глобальное потепление. Время зацветания влияет и на урожайность сельскохозяйственных культур. Для зерновых культур, переход к цветению является ключевым этапом развития, который определяет количество и качество получаемых семян. У таких овощных культур, как капуста, сахарная свекла или кормовые травы, ранний переход к цветению приводит к потере урожая.

Ключевые регуляторы перехода к цветению и их аллельное разнообразие хорошо изучены у модельных видов растений, а в последние годы большое число гомологичных генов цветения обнаружено и у культурных видов. Идентифицированные последовательности регуляторов цветения могут использоваться селекционерами в качестве функциональных

маркеров для отбора предпочтительных генотипов или для целенаправленного управления признаками цветения посредством генетических модификаций. Например, для увеличения биомассы урожая листовой китайской капусты (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) Salehi и соавторы (Salehi et al., 2005) предложили увеличить вегетационный период этой культуры. Для этого цветение было задержано, главным образом, за счет сверхэкспрессии гена *FLOWERING LOCUS C*, основного репрессора цветения (Jung and Miller, 2009).

Таким образом, понимание генетических и молекулярных механизмов перехода к цветению открывает новые возможности для селекции растений.

1.4. Генетические системы, регулирующие переход растений к цветению

1.4.1. Основные пути регуляции перехода к цветению

Процессы роста и развития растений находятся под контролем сложных генетических механизмов и регулируются внешними и внутренними факторами. Реализация каждой генетической программы развития осуществляется в постоянно изменяющихся условиях внешней среды. Поэтому для растений определяющее значение имеет согласованный (интегрированный) ответ на внешние и внутренние факторы, участвующие в регулировании процессов роста и развития каждой клетки и целого растительного организма (Медведев, 2004). К внутренним факторам, влияющим на ростовые процессы, относятся, прежде всего, фитогормоны, а к внешним – температура (ее величина и периодичность), свет (его интенсивность, спектральный состав, продолжительность и периодичность), минеральные и органические питательные вещества, влажность почвы и воздуха, механические воздействия и др. Инициация перехода от вегетативной фазы развития растений к репродуктивной включает три стадии: 1) индукция цветения с образованием флорального стимула; 2) транспорт флорального стимула; 3) эвокация цветения.

Индукция цветения осуществляется эндогенными и экзогенными факторами. К эндогенным факторам относятся эндогенные ритмы и содержание фитогормонов, к экзогенным – свет и температура. В ответ на эти факторы запускаются молекулярные механизмы, приводящие к появлению в листьях мобильного сигнала (флоригена), который инициирует формирование зачатков цветка в апикальной меристеме побега (shoot apical meristem, SAM) и тем самым индуцирует цветение (Чайлахян, 1937).

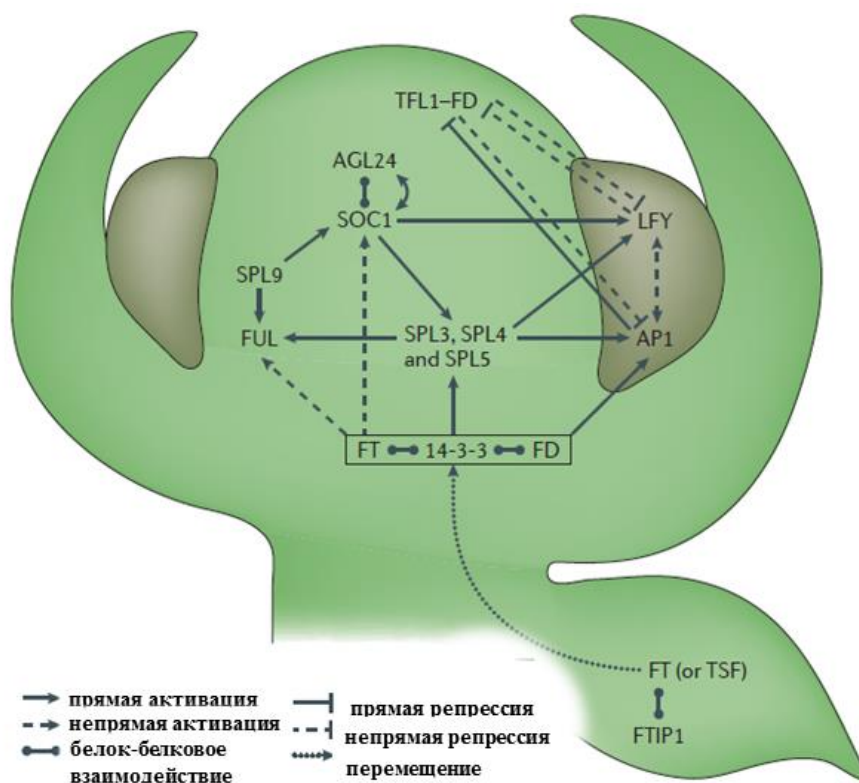


Рис 4. Генетическая регуляция индукции цветения в апикальной меристеме побега (по Andres and Coupland., 2012, с изм.).

Генетические основы перехода к цветению, включая механизмы формирования и передачи флоральных сигналов, хорошо изучены на модельном растении *A. thaliana*. Были определены четыре основных сигнальных пути перехода к цветению: холодовой, фотопериодический, автономный и гиббереллин-зависимый (рис.4). Сигналы, формирующиеся в этих путях, передаются по генетическим сетям к основным генам-

интеграторам: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* и *LEAFY (LFY)*. В апикальной меристеме побега белок FLOWERING LOCUS T в комплексе с белком FLOWERING LOCUS D активирует экспрессию транскрипционного фактора SQUAMOSA BINDING PROTEIN LIKE (SPL) генов идентичности флоральных меристем: *LEAFY*, и *APETALA1/CAULIFLOWER/FRUITFULL (API/CAL/FUL)*. Генам-интеграторам противодействуют гены-супрессоры перехода к цветению: *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* и *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*. Таким образом, переход растений к цветению осуществляется посредством активации и/или супрессии генов, контролирующих процесс цветения (Andres and Coupland, 2012).

1.4.1.1. Фотопериодический путь

Сезонные изменения длины дня (фотопериода) влияют на процесс перехода растений к цветению. Ключевую роль в фотопериодической регуляции цветения играет ген *CONSTANS (CO)* (рис. 5) (Turck et al., 2008; Andres and Coupland., 2012). У длиннодневных видов растений белок CONSTANS накапливается только на длинном дне, стабилизируется светом и быстро разрушается в темноте (Valverde et al., 2004). CONSTANS экспрессируется в паренхиме сосудистой системы листьев и активирует экспрессию гена *FLOWERING LOCUS T*. В течение суток ген *CONSTANS* экспрессируется циклически. Регуляция цветения по фотопериодическому пути происходит посредством восприятия светового сигнала различными фоторецепторами, различающими качество и количество света (Putterill et al., 2004). Свет является основным сигналом, синхронизирующим циркадные часы с сезонными изменениями в длине дня (Mouradov et al. 2002).

По восприятию основных компонентов белого света фоторецепторы разделяются на фитохромы PHYA, PHYB, PHYC, PHYD, PHYE (красный и дальний красный свет) и криптохромы CRY1, CRY2, CRY3 (синий свет). Сигналы, воспринимаемые фоторецепторами в ответ на качество и

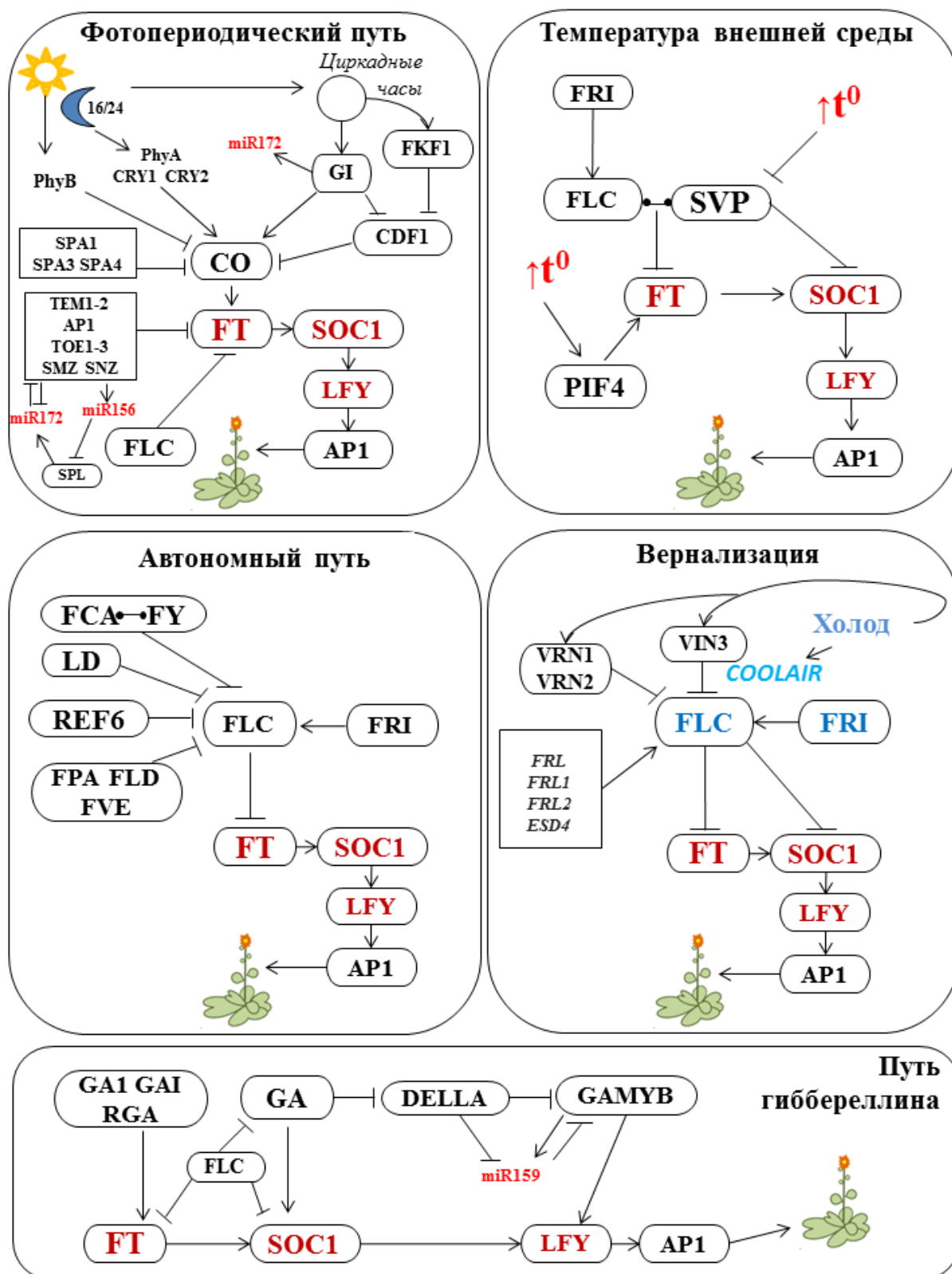


Рис. 5. Основные пути инициации цветения на примере *A. thaliana*. Ключевыми генами в путях инициации цветения: *CONSTANS* (CO), *FLOWERING LOCUS C* (FLC), *FLOWERING LOCUS T* (FT), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (SOC1), *LEAFY* (LFY) и *APETALA 1/FRUITFUL/CAULIFLOWER* (AP1/FUL/CAL).

количество света, передаются по генетическим цепям к циркадным часам (рис. 5).

Фитохромы PHYA - PHYE и криптохромы CRY1 и CRY2 являются основными фоторецепторами, вовлеченными в регуляцию циркадных часов. Фитохром PHYB участвует в деградации белка CONSTANS в утренние часы, тогда как CRY1, CRY2 и PHYA необходимы для стабилизации этого белка в конце дня, причем действие этих стабилизаторов взаимозаменяемое.

В деградацию белка CONSTANS также вовлечены белки SUPPRESSOR OF PHYA-105-1 (SPA1), SPA3 и SPA4 (Valverde et al., 2004). Под контролем циркадных часов в условиях длинного дня (ДД) экспрессия *CONSTANS* также регулируется белками GIGANTEA (GI), FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1) и CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1) (Srikanth et al, 2011). Способности *CONSTANS* индуцировать экспрессию *FLOWERING LOCUS T* противодействуют несколько регуляторов, которые репрессируют этот ген посредством различных механизмов или путей, тем самым предотвращая преждевременное цветение (Yant et al., 2009). Это так называемые флоральные гены-репрессоры: *TEMPRANILLO1* и *2* (*TEM1* и *TEM2*), *APETALA2* (*AP2*), *TARGET OF EAT 1–3* (*TOE1–3*), *SCHLAFMUTZE* (*SMZ*) и *SCHNARCHZAPFEN* (*SNZ*) и *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (Srikanth et al., 2011). Взаимодействие этих генов схематически представлено на рис. 5.

Важную роль в пластичности развития растений, включая определение времени перехода к цветению, играет реакция на затенение, воспринимаемая как изменение интенсивности и спектрального состава света. Изменение соотношения красного и дальнего света воспринимается описанными выше фитохромными рецепторами. Ответ растения на эти изменения не зависит от фотопериодической реакции; в нем участвуют гены *FLOWERING LOCUS C* и *FRIGIDA* и фактор процессинга РНК FY (Adams et al., 2009).

1.4.1.2. Вернализация

Одним из факторов внешней среды, запускающих процесс цветения, является продолжительное холодное воздействие, или вернализация

(яровизация). Вегетационный период раннецветущих экотипов арабидопсиса в условиях длинного дня составляет несколько недель, а поздноцветущих – несколько месяцев. Однако после воздействия низких положительных температур (4°C) на протяжении 4-8 недель время зацветания поздноцветущих экотипов приближается ко времени зацветания раннецветущих экотипов (Michaels et al., 2000). В случае арабидопсиса молекулярно-генетическая регуляция вернализации исследована достаточно подробно (Kim and Song, 2014). У видов *Arabidopsis* время зацветания ранне- и поздноцветущих экотипов определяется соотношением сильных и слабых аллелей генов *FLOWERING LOCUS C* и *FRIGIDA*. Одновременное присутствие активных аллелей двух этих генов обуславливают поздноцветущий фенотип, потеря функциональности одного из этих генов приводит к раннему зацветанию (Johanson et al., 2000; Kim et al., 2009).

Ген *FLOWERING LOCUS C* кодирует MADS-бок фактор транскрипции, высокий уровень экспрессии которого приводит к подавлению цветения. Ген *FRIGIDA* необходим для усиления экспрессии *FLOWERING LOCUS C* (Johanson et al., 2000; Michaels and Amasino, 1999). Белок *FLOWERING LOCUS C* ингибирует цветение путем репрессии генов *FLOWERING LOCUS T*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* и *FLOWERING LOCUS D* (Michaels, 2009). При экспрессии *FLOWERING LOCUS C* в проводящих тканях листа происходит репрессия транскрипции *FLOWERING LOCUS T*. В апикальной меристеме побега *FLOWERING LOCUS C* подавляет экспрессию *FLOWERING LOCUS D* и *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, что препятствует инициации апикальной меристемы в ответ на перемещающийся из листа сигнал *FLOWERING LOCUS T*. Регуляция экспрессии *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* осуществляется за счет конкуренции между геном-активатором перехода к цветению *CONSTANS* и геном-репрессором *FLOWERING LOCUS C*. Белки *FLOWERING LOCUS C* и *CONSTANS* связываются с различными участками

промотора гена *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* и противодействуют друг другу (см. рис.5).

Процесс цветения запускается при низком уровне экспрессии *FLOWERING LOCUS C*, снижение которой происходит во время вернализации. Под воздействием холода запускаются механизмы эпигенетического контроля, переводящие ген *FLOWERING LOCUS C* в репрессированное состояние. Важными регуляторами процесса модификации хроматина *FLOWERING LOCUS C* являются белки *VERNALIZATION1* (*VRN1*) и *VERNALIZATION2* (*VRN2*), *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*). Белок *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* необходим для запуска молекулярных механизмов модификации хроматина *FLOWERING LOCUS C*, а *VERNALIZATION1* и *VERNALIZATION2* необходимы для поддержания *FLOWERING LOCUS C* в репрессированном состоянии (Adrian et al., 2009, Andres and Coupland, 2012). Кроме того, в ответ на холодовое воздействие возникает временное увеличение экспрессии некодирующей РНК, комплементарной *FLOWERING LOCUS C* - *COOLAIR RNA*. Транскрипция *COOLAIR RNA* может подавлять транскрипцию смысловой цепи еще до появления *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (Swiezewski et al., 2009). РНК-связывающие белки и регуляторы эпигенетического механизма так же играют важную роль в регуляции транскриптов *FLOWERING LOCUS C RNA* (Simpson et al., 2004). К другим активаторам экспрессии *FLOWERING LOCUS C* относятся: *FRIGIDA-LIKE (FRL)* гены, *FRL1* и *FRL2*, *EARLY IN SHORT DAYS 4 (ESD4)* (Michaels et al., 2004) (см. рис.5).

1.4.1.3. Регуляция цветения температурой внешней среды

Переход к цветению зависит также от температуры окружающей среды, на которую растение реагирует на протяжении всего вегетационного периода (Samach et al., 2005). В условиях повышенной температуры (25 - 27°C) на коротком дне растения *A. thaliana* зацветают раньше, чем в условиях длинного дня при 23°C. (Balasubramanian et al., 2006). Точно так же мутанты по генам *phyB* и *cry2* зацветают раньше в условиях повышенной

температуры (Blazquez et al., 2003; Halliday et al., 2003). Раннее зацветание наблюдали при повышенной температуре у растений с нефункциональными аллелями *fri* и *flc*. Напротив, растения, несущие активные аллели *FRI/FLC*, слабо реагируют на повышенную температуру, и это говорит о том, что *FLOWERING LOCUS C* играет ключевую роль в подавлении температурной индукции (Balasubramanian et al., 2006). Другим важным регулятором перехода к цветению в ответ на температуру окружающей среды является ген *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*. Этот белок является MADS box транскрипционным фактором, который связывается с промоторами генов *FLOWERING LOCUS T* и *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* и подавляет их транскрипцию (Hartmann et al., 2000, Lee et al., 2007). Взаимодействие белков *FLOWERING LOCUS C* и *SHORT VEGETATIVE PHASE* подавляет переход к цветению (Andres and Coupland, 2012).

1.4.1.4. Путь гиббереллина

Регуляторы роста растений гибберелловые кислоты (гиббереллины, GA) являются активаторами перехода растений к цветению (Putterill et al., 2004). Среди генов индукции цветения по пути гиббереллинов выделяют гены, отвечающие за биосинтез активных гибберелловых кислот *GA1*, *GA3*, *GA4* и *GA7* (Hedden and Thomas., 2012) и гены, отвечающие за пути передачи GA сигнала, *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)* и *RGA-LIKE 1 (RGL1)*, *SPY*, *PHORI (PHOTOPERIOD RESPONSIVE 1)*, *FPF1* и *SHI* (Srikanth et al., 2011). Фитогормон GA, рецептор *GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1)* и репрессор *DELLA* формируют GA–GID1–DELLA модуль каскада сигналов GA. Действие GA на цветение наиболее выражено в условиях короткого дня. Мутанты по *ga1*, у которых отсутствует первый этап биосинтеза GA, никогда не зацветают в условиях короткого дня. Мутанты по *gai* нечувствительны к GA и в условиях КД зацветают позже (Wang et al., 2013) (см. рис. 5).

1.4.1.5. Автономный путь

Помимо генов холодового пути индукции цветения в супрессию вовлечены гены автономного пути. Автономный путь регулируется генами *LUMINDEPENDENS (LD)*, *FCA*, *FY*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FVE*, *FLK*, и *REF6* (Amasino et al., 2004; Simpson, 2004). Белки, кодируемые генами автономного пути, участвуют в реорганизации хроматина и принимают участие в процессинге РНК. Такие белки как *FCA*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS K* и *FY* участвуют в процессинге РНК, а *FLOWERING LOCUS D* и *RELATIVE OF EARLY FLOWERING6* принимают участие в метилировании и деметилировании хроматина (см. рис. 5).

Переход к цветению происходит тогда, когда вернализация и гены автономного пути снижают уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C*, и накопление белка фотопериодического пути *CONSTANS* активирует экспрессию *FLOWERING LOCUS T* и *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, запуская переход к цветению (Michaels and Amasino, 2001).

1.4.1.6. Некодирующие РНК

Выделяют два типа не кодирующих РНК: микроРНК (miRNA) и длинные не кодирующие РНК (long noncoding RNA, lncRNA). Эти РНК играют важную роль в трансляции и деградации мРНК. МикроРНК представляют собой последовательности размером 21-22 нуклеотида, которые регулируют активность специфичной целевой мРНК на уровне транскрипции и/или трансляции. Регуляция осуществляется путем комплементарного связывания микроРНК с частично комплементарными сайтами в нетранслируемых участках (UTRs) мРНК генов-мишеней. Эти РНК могут также непосредственно взаимодействовать с ДНК генов в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, которое является одним из ключевых механизмов репрессии генов. Некодирующие РНК играют важную роль в определении времени зацветания. МикроРНК miR172, miR156 и miR159 и длинные не кодирующие РНК *COOLAIR* и *COLDAIR* способствуют цветению

путем регулирования экспрессии ключевых генов цветения (Matthew et al.; 2012, Spanudakis et al., 2013; Yamaguchi et al., 2012).

miR159 принимает участие в контроле перехода к цветению в гиббереллин-зависимом пути. Мишенью для miR159 являются гены семейства GAMYB, кодирующие транскрипционные факторы MYB. Эти транскрипционные факторы регулируют транскрипцию генов, индуцируемых GA, включая регулятор идентичности флоральной меристемы *LEAFY* (Yamaguchi et al., 2012).

miR172 играет важную роль в репрессии трансляции и деградации мРНК генов-мишеней (Wollmann et al. 2011). У *Arabidopsis* мишенями этой микроРНК являются мРНК генов *APETALA2*, *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TARGET OF EAT2 (TOE2)*, *TARGET OF EAT3 (TOE3)*, *SCHLAFMUTZE (SMZ)* и *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* (Yamaguchi et al., 2012).

Мишенями **miR156** являются SBP box транскрипционные факторы, *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 1 (SPL1) - SPL16*. Комплекс miR156/SPL регулирует время зацветания двумя путями: 1) снимает репрессию зацветания, вызванную активностью гена типа *APETALA2*; 2) непосредственно активировать интеграторы цветения и регуляторы идентичности меристемы. Белок *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 3* контролирует регуляторы идентичности меристемы *LEAFY*, *APETALA1* и *FRITFULL* (Yamaguchi et al., 2009). К тому же было установлено, что этот белок взаимодействует с промоторной областью *FLOWERING LOCUS T* (Kim et al. 2012). Взаимодействуя с *FLOWERING LOCUS T*, комплекс miR156/SPL3 участвует в регуляции времени цветения в ответ на температуру окружающей среды (Yamaguchi et al. 2012).

LncRNAs представляет собой некодирующую белок последовательность РНК размером более 200 нуклеотидов. Такие РНК обычно транскрибируются с другой цепи локуса, кодирующего белок. LncRNAs влияют на экспрессию генов в основном двумя путями, через

прямое воздействие на транскрипцию и вовлечение модификаторов хроматина (см. обзоры Nagano and Fraser et al., 2011; Wang and Chang et al., 2011). В качестве примера можно указать на гены *COOLAIR* и *COLDAIR*. LncRNAs регулируют экспрессию *FLOWERING LOCUS C* (De Lucia and Dean et al., 2011; Kim et al. 2012; Kim and Sung, 2012).

1.4.1.7. Взаимодействие генетических систем, регулирующих переход к цветению

Генетические пути, которые регулируют переход к цветению, не изолированы друг от друга, а составляют сложную генетическую сеть, которая обеспечивает точное регулирование относительно небольшого числа интеграторов цветения, представляющих собой общие ключевые точки пересечения отдельных путей (crossroads). *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* и *LEAFY (LFY)* являются важными регуляторными точками в сети, контролирующей цветение (рис. 6). Экспрессия *FLOWERING LOCUS C* регулируется по пути вернализации и автономному пути. *FLOWERING LOCUS C* подавляет гены-интеграторы цветения *FLOWERING LOCUS T* и *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*. Действие *FLOWERING LOCUS T* и *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* находится под контролем фотопериодического пути на транскрипционном уровне. Активация *FLOWERING LOCUS T* является особенно важным этапом в переходе к цветению, так как является компонентом сигнала цветения «флоригена». Интеграция внешних и внутренних сигналов в листе приводит к экспрессии *FLOWERING LOCUS T*, и этот белок по флоэме перемещается в апикальную меристему, где инициирует переход к цветению (Andres and Coupland, 2012).

Последним важным шагом является индукция регуляторов идентичности меристемы, таких как *LEAFY*. Специфический транскрипционный фактор *LEAFY* активирует многие другие гены-мишени, запуская программу формирования цветка.

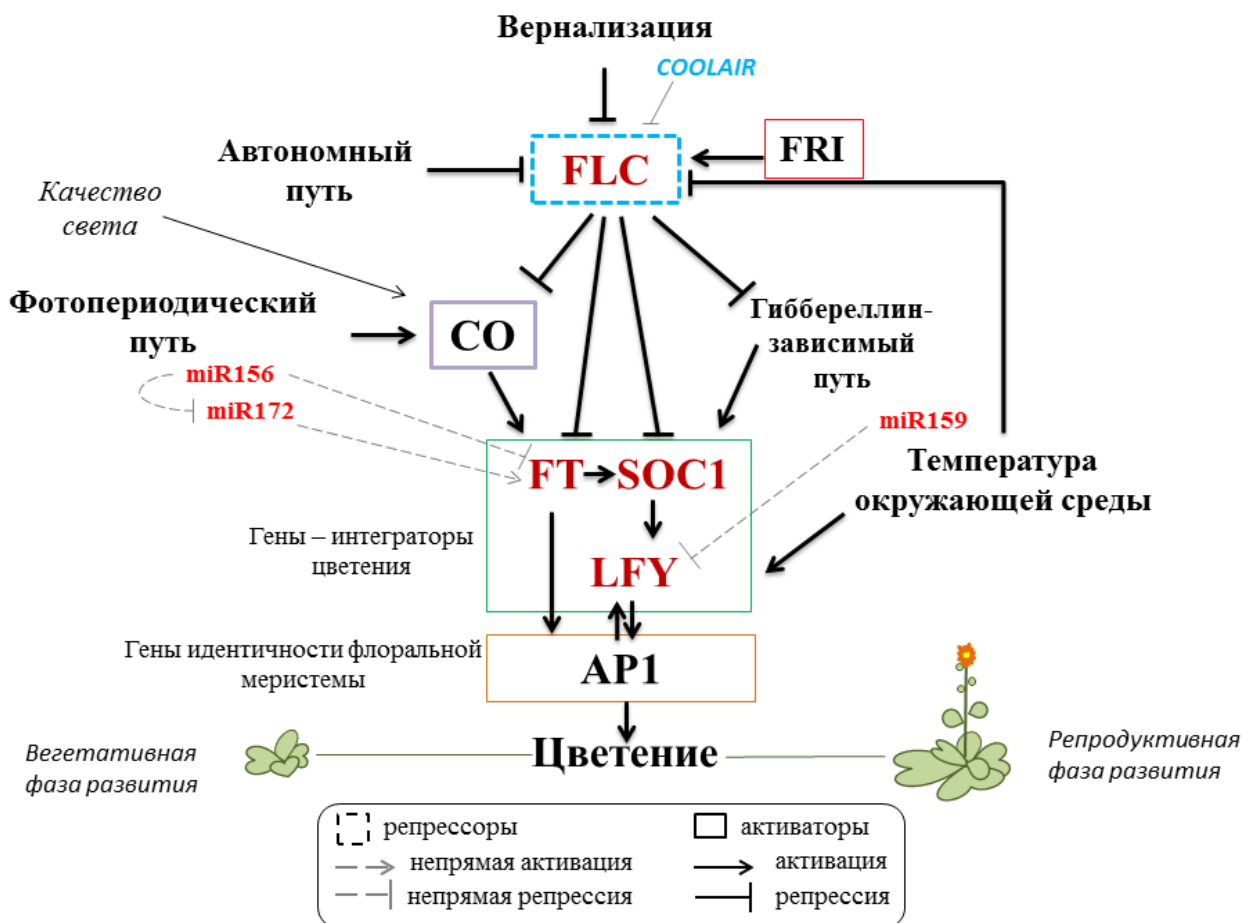


Рис. 6. Ключевые «точки» в генетической системе, регулирующей переход к цветению. *FLOWERING LOCUS C (FLC)* – репрессор цветения, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* и *LEAFY (LFY)* – активаторы цветения.

1.5. Частные модели регуляции пути вернализации

Разнообразие в поведении растений в ответ на холодовую индукцию цветения можно объяснить, используя три модели регуляции этого процесса (рис. 7).

Во время вернализации *A. thaliana* экспрессия *FLOWERING LOCUS C* снижается, затем следует индукция транскрипции *FLOWERING LOCUS T* и *TWIN SISTER OF FT (TSF)* посредством *CONSTANS* в условиях длинного дня (рис. 7А).

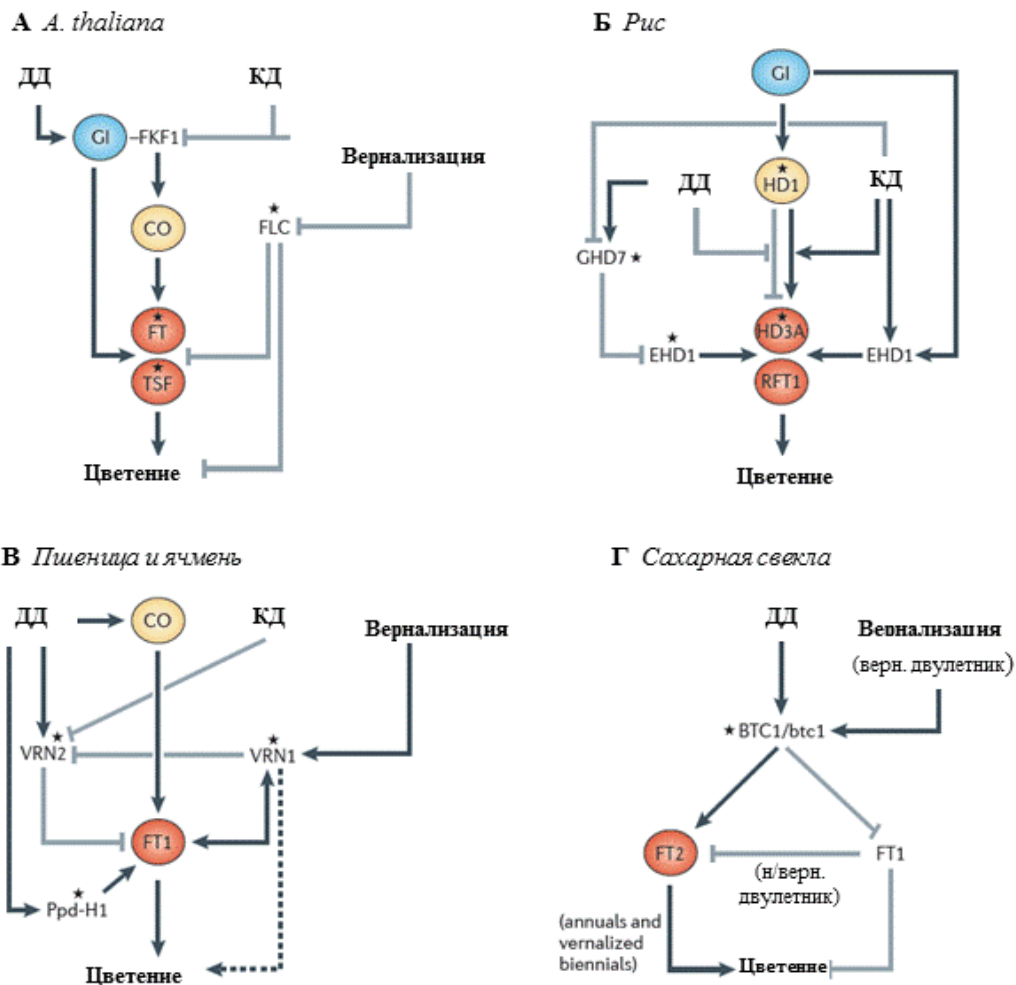


Рис. 7. Модели процесса холодной индукции цветения. (А) – *A. thaliana*; (Б) – рис; (В) – пшеница и ячмень; (Г) – сахарная свекла. ДД – длинный день; КД – короткий день. Серыми и черными линиями обозначена репрессия и индукция, соответственно. Звездочкой отмечены гены, аллельное разнообразие которых связано со временем перехода к цветению. Красные круги обозначают гомологи гена *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), желтые – гомологи *CONSTANS* (*CO*) и голубые – гомологи *GIGANTEA* (*GI*) (по Andres and Coupland, 2012)

По сравнению с *A. thaliana*, гомолог *CONSTANS* у риса, *HEADING DATE 1* (*HD1*), подавляет цветение в условиях длинного дня, ингибируя гена *HEADING DATE 3A* (*HD3A*), но в условиях короткого дня *HEADING DATE 1* (*HD1*) способствует транскрипции гомологов *FLOWERING LOCUS T*, *HEADING DATE 3A* и *RICE FT-LIKE 1* (*RFT1*). В свою очередь, *HEADING DATE 3A* и *RICE FT-LIKE 1* способствуют цветению, подобно *FLOWERING LOCUS T* и *TWIN SISTER OF FT* в *A. thaliana*. *GHD7* является репрессором

цветения в условиях длинного дня и подавляет транскрипцию *EARLY HEADING DATE 1 (EHD1)* (Xue et al., 2008). Этот ген активирует транскрипцию *HEADING DATE 3A* и *RICE FT-LIKE 1* в условиях короткого дня. В растениях риса *GIGANTEA (GI)* усиливает транскрипцию *HEADING DATE 1*, подобно *GIGANTEA* и *CONSTANS* в *A. thaliana*. Современные модели регуляции цветения риса в условиях короткого дня предполагают, что совпадение действия света и суточных ритмов в *EHD1* или *GHD7* приводит либо к активации, либо к репрессии транскрипции *HEADING DATE 3A*, соответственно, и что это может обеспечить своевременную реакцию на сезонные изменения длины дня (Itoh et al., 2010, Osugi et al., 2011). Для перехода к цветению рис не нуждается в вернализации. У пшеницы и ячменя индукция цветения происходит в условиях длинного дня. В ответ на длинный день гомологи белка *CONSTANS* активируют *FT-like* гены (Campoli et al., 2011). Однако для транскрипционной активности *FT-like* генов в условиях длинного дня также необходим белок *Ppd-H1* (Turner et al., 2005). Подобно *A. thaliana*, для перехода к цветению эти виды нуждаются в вернализации. Во время вернализации, возрастает транскрипция гена *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, который кодирует *MADS* box транскрипционный фактор, сходный с белками *FRUITFULL* и *APETALA1* из *A. thaliana*. *VERNALIZATION 1* усиливает развитие соцветия и репрессирует *VERNALIZATION 2*. В условиях длинного дня белок *VERNALIZATION 2* блокирует экспрессию *FLOWERING LOCUS T 1*, подобного *FLOWERING LOCUS T* из *A. thaliana* и эта экспрессия подавляется во время вернализации посредством *VERNALIZATION 1* (см. рис. 7). В условиях короткого дня экспрессия гена *VERNALIZATION 12* подавляется, вследствие чего возрастает экспрессия *FLOWERING LOCUS T1*, и запуск цветения происходит летом (Cockram et al., 2007). У сахарной свеклы, ген *BOLTING TIME CONTROL 1* регулирует сигналы от путей фотопериодической индукции. У однолетних форм, доминантный аллель *BOLTING TIME CONTROL 1* индуцирует цветение в условиях длинного дня посредством репрессии *FLOWERING LOCUS T 1* и

активации *FLOWERING LOCUS T 2* (Pin et al., 2012). Двулетняя сахарная свекла содержит рецессивный аллель *btc1*, который не блокирует экспрессию репрессора цветения *FLOWERING LOCUS T 1*. Такой аллель *btc1* становится достаточно активным, чтобы подавить экспрессию *FLOWERING LOCUS T 1* и индуцировать *FLOWERING LOCUS T 2*, и тем самым запустить процесс цветения, только после вернализации (Andres and Coupland, 2012) (см. рис. 7).

1.6. Механизм вернализации на примере *A. thaliana*

1.6.1. Гены *FRIGIDA* и *FLOWERING LOCUS C*

Жизненные формы *A. thaliana* обычно разделяют на раннецветущие и поздноцветущие. Однолетние раннецветущие растения арабидопсиса рано зацветают в условиях длинного дня (ДД), и их жизненный цикл длится всего несколько недель. Поздноцветущие экотипы в условиях длинного дня могут расти несколько месяцев и не зацветать. Однако, если растения поздноцветущего экотипа подвергнуть вернализации, время их зацветания в условиях длинного дня приблизится ко времени зацветания раннецветущего экотипа (Johanson et al., 2000; Michaels and Amasino, 2000).

Классический генетический анализ различий между поздно- и раннецветущими экотипами показал, что поздноцветущие экотипы содержат активные аллели *FLOWERING LOCUS C (FLC)* и *FRIGIDA (FRI)*, в то время как раннецветущие экотипы содержат мутации в одном или обоих этих генах (Clarke and Dean, 1994). Таким образом, эти гены являются основными факторами, определяющими природное разнообразие по времени зацветания у *A. thaliana* (Shindo et al., 2005; Stinchcombe et al., 2005). Предполагается, что раннецветущие экотипы произошли от поздноцветущих экотипов в результате мутаций в последовательностях *FRIGIDA* и/или *FLOWERING LOCUS C*, которые привели к потере функции гена (Johanson, et al., 2000; Michaels et al., 2003). У большинства раннецветущих экотипов наблюдается низкий уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* и наличие нефункционального аллеля *FRIGIDA*, а у поздноцветущих экотипов

наблюдается высокий уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* и наличие функционального аллеля *FRIGIDA*. Таким образом, аллельное разнообразие гена *FRIGIDA* является основным фактором, определяющим изменение времени цветения (Shindo et al., 2005).

При более подробном изучении аллельного разнообразия гена *FRIGIDA* из *A. thaliana* было показано, что различие между популяциями в требовании к вернализации связано с изменениями в кодирующей области *FRIGIDA* (Le Corre et al., 2002; Shindo et al., 2005). Ген *FRIGIDA* состоит из трех экзонов и двух интронов и содержит области, соответствующие coiled-coil доменам, на обоих концах гена (Johanson et al., 2000). Область первого экзона является наиболее вариабельной и содержит больше несинонимичных замен, чем второй и третий экзон. Мутации в этой области, нарушающие функции гена, включают сдвиг рамки считывания или возникновение стоп-кодонов, обуславливают способность природных популяций *A. thaliana* адаптироваться в местных условиях (Le Corre et al., 2002; Shindo et al., 2005; Stinchcombe et al., 2004).

Johanson и соавторы (Johanson, et al., 2000) идентифицировали у *A. thaliana* два рецессивных аллеля *FRIGIDA* в раннецветущих экотипах Columbia (Col) и Landsberg erecta (*Ler*). В отличие от поздноцветущего экотипа Н51, в последовательностях этих рецессивных аллелей *FRIGIDA* обнаружены две различающиеся делеции, которые нарушают открытую рамку считывания, что приводит к потере функциональности гена. Последовательность гена *FRIGIDA* у экотипа Col отличается от функциональной последовательности Н51 двумя несинонимичными аминокислотными заменами (Gly146 – Glu и Met148 – Ile), которые приводят к потере сайта рестрикции Bsm FI), и делецией в 16 пар нуклеотидов (п.н.) в области первого экзона, которая приводит к появлению преждевременного стоп-кодона в начале второго экзона. Между аллелями *FRIGIDA* из экотипов Н51 и *Ler* обнаружены три отличия: две однонуклеотидные замены, приводящие к сдвигу рамки считывания, и индел полиморфизм: делеция (376

п.н.), совмещенная с инсерцией (31 п.н.), - который приводит к удалению старт-кодона и тем самым нарушает начало открытой рамки считывания. Инсерция длиной 31 п.н. появилась, вероятно, в результате частичной дубликации последующего участка длиной 53 п.н. и содержит ATG кодон, который может быть воспринят как старт-кодон во время трансляции. В результате вне рамки считывания может образоваться короткий белок длиной в 41 аминокислотный остаток. Однако транскрипты *FRIGIDA* у растений экотипа *Ler* обнаружены не были, тогда как у экотипов *H51* и *Col* такие транскрипты присутствовали. Результаты сравнительного анализа последовательностей *FRIGIDA* из ранне- и поздноцветущих экотипов на основании двух делеций, 16 и 376 п.н., и несинонимичной аминокислотной замены, Gly146 - Glu, обуславливающей наличие или отсутствие сайта рестрикции *Bsm FI*, позволили предположить, что аллель *FRIGIDA* из поздноцветущего экотипа является предковой формой гена, а раннецветущие экотипы произошли от поздноцветущих экотипов в результате делеций в гене *FRIGIDA*, приводящих к потере функциональности этого гена (Johanson et al. 2000). Позже, Le Corre и соавторы (Le Corre et al., 2002) подтвердили эти результаты и обнаружили еще шесть мутаций, приводящих к потере функциональности гена *FRIGIDA* и к раннему зацветанию.

Некоторые раннецветущие экотипы могут содержать последовательности *FRIGIDA* с неповрежденной открытой рамкой считывания. Это может произойти по трем следующим причинам. Первая, некоторые из наблюдаемых синонимичных замен в гене *FRIGIDA* могли изменить или подавить функцию белка. Вторая, экспрессию *FRIGIDA* могли нарушать мутации в промоторной области гена. Третья, раннее цветение могло произойти в результате действия других генов, регулирующих процесс цветения. (Le Corre et al., 2002).

В отличие от *A. thaliana*, у большинства исследованных последовательностей *FRIGIDA* из экотипов *A. lyrata* открытая рамка считывания кодирует полноразмерный белок, т.е. в этом случае не было

обнаружено мутаций типа *Col* и *Ler*, которые привели бы к значительным нарушениям в белке (преждевременному стоп-кодону, сдвигу рамки считывания или изменению в старт-кодоне). Однако эти последовательности содержали многочисленные несинонимичные и синонимичные замены. Как и у *A. thaliana*, в последовательностях *FRIGIDA* у *A. lyrata* первый экзон является более вариабельным, чем второй и третий. Отношение числа синонимичных полиморфизмов к числу несинонимичных между близкородственными видами *A. lyrata* и *A. thaliana* было значительно выше в первом экзоне, чем во втором и третьем. Среди множества несинонимичных полиморфизмов наибольший интерес представляет индел в 42 п.н. в области третьего экзона, который приводит к образованию варианта белка, укороченного на длине в 14 а.о. Длинный и короткий аллельные варианты гена *FRIGIDA* транскрибируются, кодируют функциональные белки и обуславливают разницу во времени зацветания на 15 дней. Помимо индела, эти аллели отличались четырьмя аминокислотными заменами, одна из которых находилась в пределах coiled-coil домена. Поэтому вполне вероятно, что и другие несинонимичные полиморфизмы в области гена *FRIGIDA* могут влиять на время зацветания (Kuittinen et al., 2008). Таким образом, полиморфизмы последовательностей гена *FRIGIDA* влияют на время зацветания растений в популяциях *A. thaliana* и *A. lyrata*. Однако в структуре гена присутствуют различия, которые, вероятно, возникли из-за разницы жизненных циклов развития. У *A. thaliana* независимые мутации в последовательности гена *FRIGIDA*, приводящие к потере функциональности, обуславливают способность к локальной адаптации, но у *FRIGIDA A. lyrata* таких мутаций практически не обнаружено. В качестве альтернативы, у *A. lyrata* в последовательностях *FRIGIDA* найдены нетипичные изменения, например, индел в 16 п.н., которые не приводят к потере функции гена.

По сравнению с *A. thaliana*, результаты исследования Kuittinen et al. (2008) не поддерживают представление о ведущей роли гена *FRIGIDA* в диверсификации популяций *A. lyrata*: поздноцветущие популяции в северной

Европе одновременно содержали поздно– и раннецветущие аллельные варианты *FRIGIDA*, а среди раннецветущих популяций южной Европы часто встречались аллельные варианты *FRIGIDA*, ассоциированные с поздним цветением. Вероятно, полиморфизм этих популяций по времени перехода к цветению связан и с другими генетическими факторами, ответственными за этот признак. Однако данные Kuittinen et al. (2008) позволяют предположить, что полиморфизм гена *FRIGIDA* влияет на разнообразие по времени зацветания внутри некоторых популяций *A. lyrata* и в отсутствие вернализации.

1.6.2. Молекулярный механизм вернализации и эпигенетический контроль перехода к цветению

Этот механизм заключается в репрессии гена *FLOWERING LOCUS C* путем модификаций структуры хроматина и поддержании его в репрессированном состоянии до следующего мейоза (рис. 8А).

На протяжении всего жизненного цикла растений арабидопсиса ген *FLOWERING LOCUS C* проходит через три состояния (рис. 8А). Первое, активное состояние, когда белок *FRIGIDA* обеспечивает высокий уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C*. Такой уровень экспрессии устанавливается во время полового размножения и позднего эмбриогенеза (Choi et al., 2009). Этот механизм гарантирует, что для перехода к цветению каждое новое поколение растений, полученных от вернализованных родителей, снова нуждается в вернализации; этот механизм предотвращает преждевременное цветение осенью. Второе, полуактивное состояние, когда экспрессия *FLOWERING LOCUS C* начинает снижаться. На этой стадии происходит переход из активного в репрессированное состояние в результате снижения уровня экспрессии *FLOWERING LOCUS C* в ответ на холодовое воздействие. Третье, репрессированное состояние этого гена, которое поддерживается эпигенетическими механизмами (Adrian et al., 2009).

С учетом постепенного изменения уровней экспрессии *FLOWERING LOCUS C* в ответ на воздействие холодом, процесс вернализации можно

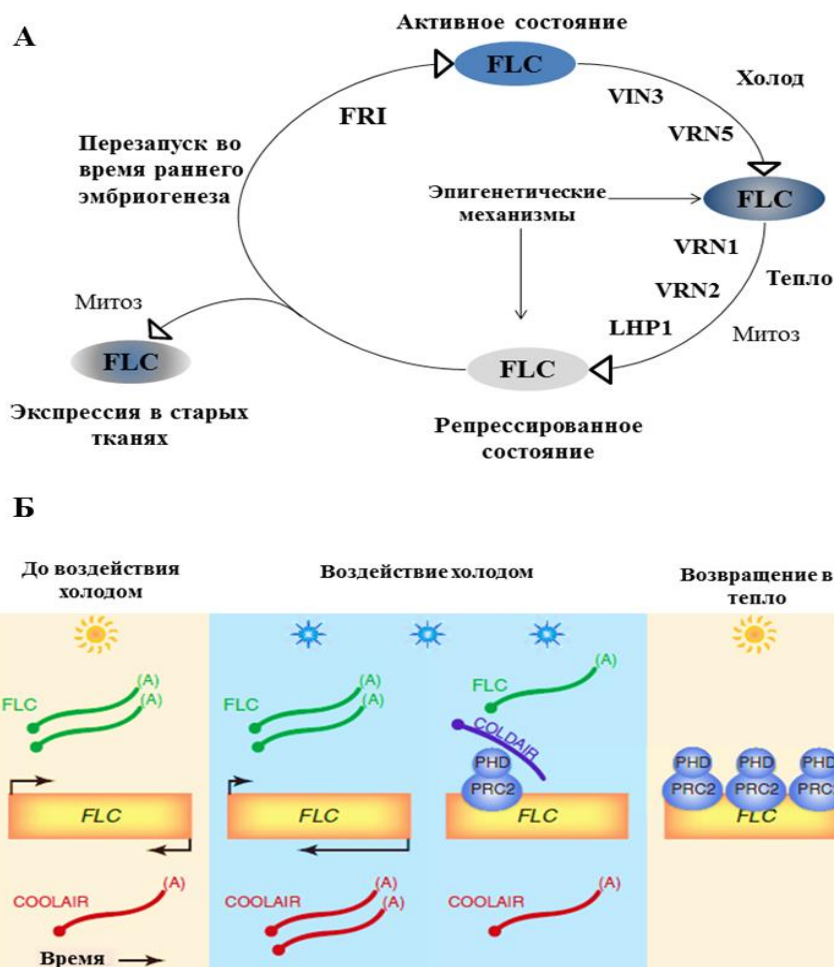


Рис. 8. (А) Состояние *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) на протяжении жизненного цикла растений *Arabidopsis*. *FRIGIDA* (*FRI*) активирует транскрипцию *FLC*; *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) и *VERNALIZATION 5* (*VRN5*) — инициаторы репрессии *FLC* в ответ на воздействие холодом; *VERNALIZATION 1-2* (*VRN1-2*) и *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN* (*LHP1*) — репрессоры, поддерживающие *FLC* в подавленном состоянии, после возвращения в теплые условия (по Adrian et al , 2009).

(Б). Три фазы процесса вернализации. *COOLAIR* - некодирующий транскрипт антисмысловой нити *FLC*, *COLDAIR* - некодирующий транскрипт смысловой нити *FLC*, *PHD-PRC2* – комплекс, необходимый для модификации хроматина в локусе *FLC* (По Ietswaart et al, 2012).

разделить на три фазы: 1) определение стационарного уровня экспрессии *FLOWERING LOCUS C* до воздействия холодом; 2) репрессия (silencing) этого гена посредством воздействия холодом; 3) поддержание эпигенетического подавления экспрессии *FLOWERING LOCUS C* после возвращения в теплые условия (рис. 8Б). Экспрессия *FLOWERING LOCUS C*

во время определенных фаз вернализации контролируется регуляторами, активирующими транскрипцию этого гена, механизмами эпигенетического контроля, которые представлены белковыми комплексами, изменяющими структуру хроматина *FLOWERING LOCUS C*, и некодирующими смысловыми и длинными несмысловыми РНК (COOLAIR и COLDAIR, соответственно).

Установка уровня экспрессии FLC до воздействия холодом. В настоящее время известно множество регуляторов, которые устанавливают

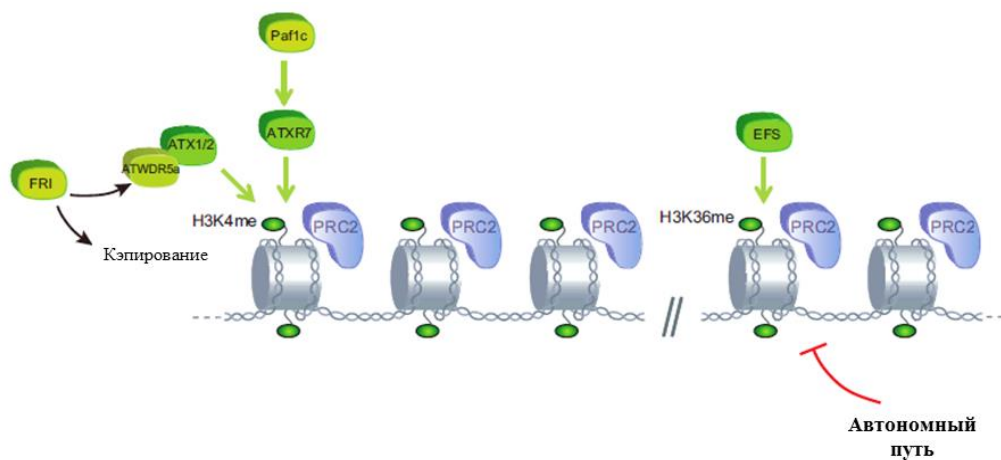


Рис. 9. Пути, регулирующие уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) до воздействия холодом. Зеленым обозначены пути, усиливающие экспрессию *FLC*, красным обозначены пути, репрессирующие *FLC*. ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 (ATXR7) и ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1/ ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX 2 (ATX1/ATX2) - H3K4- метилазы; EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS) - H3K36 метилтрансфераза; PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) – комплекс, состоящий из белков VERNALIZATION 2 (VRN2), SWINGER (SWN), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) и MUSASHI RNA-BINDING PROTEIN (MSI1); Paf1C (RNA polymerase-associated factor 1 complex) - РНК-связывающий комплекс, связывается с РНК-полимеразой II и играет важную роль при элонгации транскрипции, а также модификации гистонов (По Song et al., 2012).

начальный уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* и влияют на состояние хроматина или действие мРНК (рис. 8Б, рис. 9).

Основным регулятором, повышающим уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C*, является белок FRIGIDA (Johanson et al., 2000). Белок FRIGIDA регулирует высокий уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* на этапе кэпирования, непосредственно взаимодействуя с кэп-связывающим комплексом (nuclear cap-binding complex, CBC) (Geraldo et al., 2009). Затем происходит накопление белка ATWDR5a на гене *FLOWERING LOCUS C* и, как следствие, увеличение триметилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4) (Jiang et al., 2009). Комплекс PRC2 связывается с локусом до, во время и после воздействия холодом (рис. 10А).

Автономный путь осуществляет серию процессов, которые связывают процессинг РНК с деметилированием H3K4, тем самым подавляя активаторы *FLOWERING LOCUS C*. Таким образом, высокий уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* поддерживается в стационарном состоянии до начала процесса вернализации.

Репрессия (silencing) гена FLOWERING LOCUS C посредством воздействия холодом. В ответ на воздействие холодом наступает вторая фаза процесса вернализации. Во время этой фазы происходит снижение уровня транскрипции *FLOWERING LOCUS C*. Этот процесс регулируют некодирующие РНК и механизмы модификации хроматина (рис. 8Б, рис. 10). После 1-2 недель воздействия холода число транскриптов COOLAIR увеличивается. Это приводит к подавлению несплайсированных транскриптов *FLOWERING LOCUS C*, но не функциональных мРНК, подавление которых требует более продолжительного воздействия холодом (Song et al., 2012). Далее, после 3-6 недель воздействия холодом, формируется комплекс PHD–PRC2, который доставляется транскриптами COLDAIR в специфичную область гена *FLOWERING LOCUS C*, где начинается увеличение триметилирования H3K27 (рис. 8Б, 10В) (De Lucia et al., 2008; Ietswaart et al., 2012).

Поддержание эпигенетического подавления экспрессии FLOWERING LOCUS C после возвращения в тепло. Третья фаза вернализации начинается,

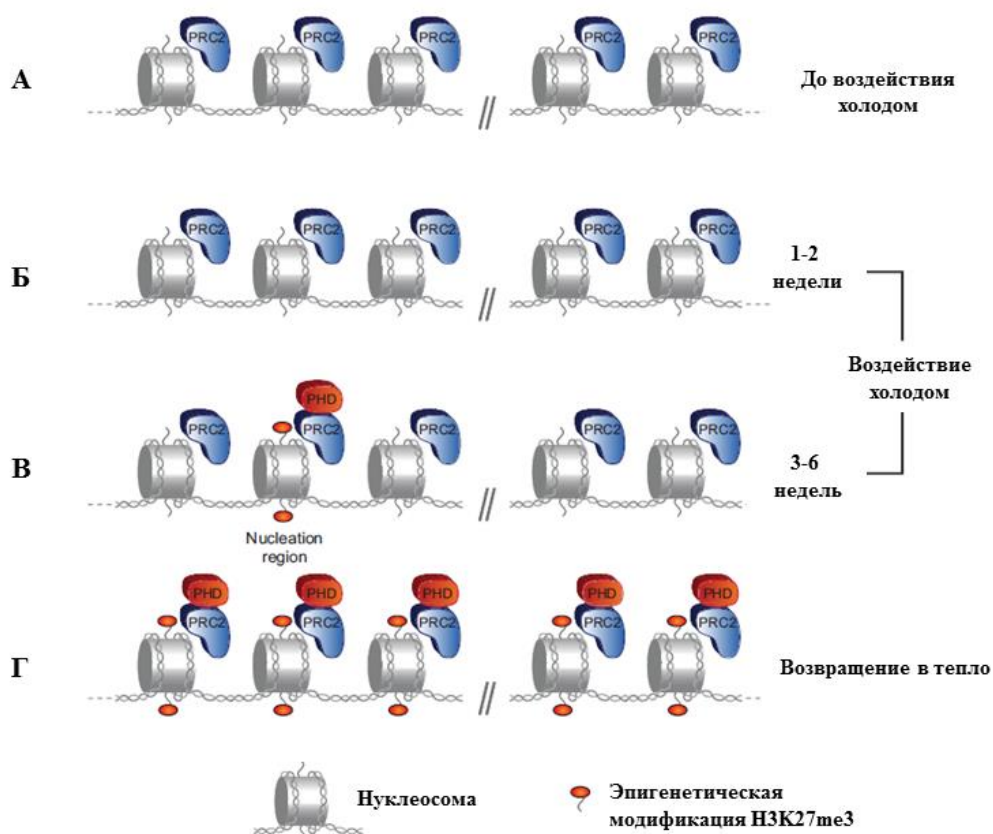


Рис. 10. Экспрессия *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) во время различных стадий вернализации. А - установка экспрессии *FLC* до воздействия холодом; Б и В - подавление экспрессии *FLC* во время 1-2 недель и 3-6 недель воздействия холодом, соответственно; Г - эпигенетическое подавление (silencing) после возвращения в теплые условия; PLANT HOMEODOMAIN PROTEIN (PHD) – белки гомеодомена VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), VERNALIZATION 5 (VRN5) и VEL1 (по Song et al., 2012).

когда растения возвращаются в теплые условия после продолжительного воздействия холодных температур. Во время этой фазы происходят значительные и относительно быстрые изменения в локусе *FLOWERING LOCUS C*, которые приводят ген в подавленное состояние. В течение нескольких дней после перемещения в теплые условия комплекс PHD–PRC2 распространяется по всему локусу *FLOWERING LOCUS C*, (De Lucia et al., 2008) и следовательно модификация гистона, H3K27me3, так же усиливается по всей длине гена, что необходимо для поддержания репрессированного состояния на протяжении всего последующего жизненного цикла растения («памяти о зиме») (Amasino, 2004; Song et al., 2012). (рис. 8Б, рис. 10Г).

1.7. Белок FRIGIDA и его роль в процессе вернализации

Белок FRIGIDA из *A. thaliana* длиной 576 а.о. принадлежит к суперсемейству белков FRIGIDA. Все представители этого суперсемейства содержат консервативный центральный домен Frigida и специфичные С- и N-концевые области. По консервативным последовательностям N-концевой области суперсемейство FRIGIDA можно разделить на пять различных семейств, FRIGIDA I–V. Белки семейства FRIGIDA I содержат консервативный центральный домен, включающий характерные аминокислотные остатки, что позволяет выявить ортологи FRIGIDA и правильно их аннотировать. N-концевая область содержит 37 аминокислотных остатков (а.о.), которые характерны только для семейства FRIGIDA I. Семейство FRIGIDA II представлено белками FRIGIDA-LIKE1 и FRIGIDA-LIKE2. В N-концевой области они содержат участок длиной 60 а.о., характерный только для данного семейства. Семейства FRIGIDA III и FRIGIDA IV представлены белками FRIGIDA-LIKE 3 и FRIGIDA-LIKE4a, FRIGIDA-LIKE4b; соответственно. N-концевые области этого белка также характерны только для членов определенного семейства. Семейство FRIGIDA V представлено белком FRIGIDA-LIKE5. Различия специфичных С- и N-концевых областей говорят о разных биологических функциях этих белков. FRIGIDA и FRIGIDA-LIKE 1/2 (FRL1/2) необходимы для экспрессии FLOWERING LOCUS C, о роли других белков в настоящее время ничего неизвестно (Risk et al. 2010).

Белок FRIGIDA из *A. thaliana*, является представителем семейства FRIGIDA I. Он содержит консервативный центральный домен Frigida и специфичные С- и N-концевые области, несущие coiled-coil домены (Johanson et al. 2000; Michaels et al. 2004). С-концевая область критична для функциональной активности белка FRIGIDA: в ее отсутствие FRIGIDA не может способствовать транскрипции FLOWERING LOCUS C. Механизм, с помощью которого FRIGIDA активирует экспрессию этого гена, изучен недостаточно. В настоящее время на примере FRIGIDA из *A. thaliana*

определена роль этого белка в активации транскрипции *FLOWERING LOCUS C*: 1) взаимодействие с кэп-связывающим комплексом (CBP, cap-binding protein complex) (Geraldo et al. 2009); 2) формирование комплекса FRI-C (Choi et al., 2011);

Для первого этапа созревания мРНК необходимо наличие CBP комплекса, состоящего из двух субъединиц CBP20 и CBP80. Потеря CBP20 приводит к снижению уровня мРНК *FLOWERING LOCUS C* и увеличению числа несплайсированных транскриптов этого гена. Как часть CBP комплекса, FRIGIDA непосредственно взаимодействует с 5'-кэп сайтом транскрипта этого гена, частично восстанавливая уровень мРНК и нормализуя соотношение сплайсированных и несплайсированных транскриптов *FLOWERING LOCUS C*. Таким образом, компенсируется потеря CBP20, и уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* возрастает (Geraldo et al., 2009).

Помимо взаимодействия с CBC комплексом, белок FRIGIDA формирует комплекс FRI-C, необходимый для активации транскрипции *FLOWERING LOCUS C*. Сборка комплекса осуществляется как физическое взаимодействие, в котором FRIGIDA действует как scaffold, т.е. является основой для сборки компонентов комплекса, FRIGIDA-LIKE 1 (FRL1), FRIGIDA ESSENTIAL1 (FES1), SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 (SUF4), и FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR (FLX) (рис. 11). Каждый белок комплекса FRI-C имеет определенную функцию. SUF4 отвечает за связывание с промотором гена *FLOWERING LOCUS C*, FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR и FRIGIDA ESSENTIAL1 необходимы для транскрипционной активности, а FRIGIDA-LIKE 1 и FRIGIDA ESSENTIAL1 стабилизируют комплекс (Choi et al, 2011; Ding et al., 2013).

В белке FRIGIDA N- и C-области важны для физического взаимодействия с компонентами FRI-C: N –концевая область FRI связывается с N –концевым регионом FRIGIDA-LIKE 1, C –концевая область FRIGIDA взаимодействует с N –концевой областью FLOWERING LOCUS C

EXPRESSOR с C –концевой областью SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 и FRIGIDA ESSENTIAL1. SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 взаимодействует с FRIGIDA-LIKE 1, и FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR взаимодействует с FES1 (рис. 11А). Высокий уровень экспрессии FLOWERING LOCUS C зависит от физического взаимодействия между специфическими активаторами и основными факторами транскрипции и модификации хроматина. Биохимический и функциональный анализ компонентов FRI-C позволил предложить модель активации транскрипции *FLOWERING LOCUS C* посредством этого комплекса (рис. 11Б).

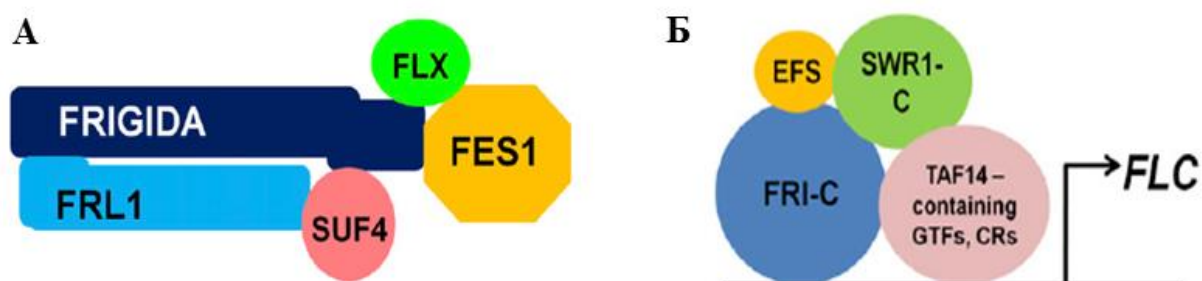


Рис. 11. Комплекс FRI-C и его участие в активации транскрипции *FLOWERING LOCUS C*. (А) Схематическое изображение взаимодействий компонентов комплекса FRI-C; (Б) Модель взаимодействия комплекса FRI-C с факторами модификации хроматина и факторами транскрипции SWR1-C, EFS, и TAF14 (по Choi et al, 2011).

Согласно этой модели, SUF4 непосредственно связывается с cis-элементом, расположенным недалеко от промотера *FLOWERING LOCUS C* и таким образом, формируется комплекс из FRI-C и другими FLC-специфичными регуляторами. Комплекс FRI-C собирает факторы модификации хроматина и основные факторы транскрипции: SWR1-C, EFS, и TAF14, перед промотором *FLOWERING LOCUS C*. Образовавшийся комплекс способствует инициации транскрипции *FLOWERING LOCUS C* и затем опосредует элонгацию транскрипции при взаимодействии с EFS в транскрибируемой области. Однако механизм активации транскрипции

образовавшимся комплексом изучен недостаточно (Choi et al, 2011; Ding et al., 2013).

1.8. Эколого-географические особенности вернализации у арабидопсиса

Факторы, запускающие цветение, и определяющая их окружающая среда меняются в зависимости от широты и особенностей климата (Simpson and Dean, 2002). У *A. thaliana* широта произрастания (широтный клин) влияет на время появления соцветия (bolting time) и зацветания (flowering time) (Brachi et al., 2013a). Считается, что экотипы вдоль широтного клина различаются по восприимчивости к вернализации. Ген *FRIGIDA* определяет природное разнообразие времени появления соцветия и зацветания в *A. thaliana*, что связано с наличием мутаций в локусе *FRIGIDA*, приводящим к потере функциональности, и предполагается, что такие изменения, способствуют адаптации к местным условиям (Johanson et al., 2000; Le Corre et al., 2002; Le Corre et al., 2005; Stinchcombe et al., 2004).

Stinchcombe и соавторы (Stinchcombe et al., 2004) показали, что экотипы с функциональным аллелем *FRIGIDA* зацветают в южных широтах значительно раньше, чем северные экотипы. Однако среди экотипов, которые несут нефункциональный аллель *FRIGIDA*, подобная корреляция не обнаружена. Эти результаты позволили предложить генетическую модель, в которой широтный клин по времени зацветания растений *A. thaliana* зависит еще от одного гена, для работы которого необходим активный аллель *FRIGIDA* (Caicedo et al., 2004). A Shindo и соавторы (Shindo et al., 2005) предположили, что такое усиление экспрессии *FLOWERING LOCUS C* у экотипов с нефункциональным аллелем *FRIGIDA* может быть связано с возникновением мутаций в генах автономного пути, репрессирующих ген *FLOWERING LOCUS C*.

Помимо широтного клина, аллельное разнообразие гена *FRIGIDA* *A. thaliana* связано с высотой места обитания растений над уровнем моря. Когда Mendez-Vigo и соавторы (Mendez-Vigo et al., 2011) описали высотный клин

по таким характеристикам, как минимальная зимняя температура и количество осадков, оказалось, что эти показатели связаны с полиморфизмом генов *FRIGIDA* и *FLOWERING LOCUS C* и, вероятно, могут быть основными климатическими факторами, оказывающими селективное давление на признаки времени перехода к цветению. Результаты этого исследования еще раз подтверждают, что аллельное разнообразие в генах *FRIGIDA* и *FLOWERING LOCUS C* способствует адаптации к климатическим изменениям. Таким образом, молекулярное разнообразие гена *FRIGIDA* сформировано адаптивной эволюцией и обеспечивает способность растений *Arabidopsis* приспосабливаться к новым климатическим условиям (Тоомаян et al., 2006). Точно так же роль гена *FRIGIDA* в адаптации к изменяющимся климатическим условиям показана при анализе QTL времени зацветания (flowering time) у *A. thaliana* (Li et al., 2010).

При генетическом анализе популяций *A. thaliana* полиморфизмы гена *FRIGIDA* обнаруживаются как QTL времени перехода к цветению и вернализации (Koornneef et al. 1998; Levy и Dean, 1998). Однако, несмотря на твердо установленное участие гена *FRIGIDA* в регуляции времени зацветания, этот ген не всегда обнаруживают среди QTLs признаков времени перехода к цветению (табл. 1) (Brachi et al., 2010, Brachi et al., 2013a; Grillo et al., 2013).

Grillo и соавторы (Grillo et al., 2013) не обнаружили связи гена *FRIGIDA* с QTL времени перехода к цветению, хотя с этим QTL была ассоциирован ген *FLOWERING LOCUS C*, на уровень экспрессии которого, как известно, влияют аллельные формы гена *FRIGIDA*. В исследованиях Brachi и соавторов (Brachi et al., 2010, Brachi et al., 2013a) среди популяций *A. thaliana*, распространенных по всему миру, большинство найденных генов, ассоциированных с изменениями во времени перехода к цветению, относились к регуляторам циркадных часов, а корреляция с генами *FRIGIDA* и *FLOWERING LOCUS C* отсутствовала.

Возникает вопрос, почему ген *FRIGIDA* не всегда попадает в QTLs признаков времени перехода к цветению?

Существует много факторов, которые могут повлиять на процесс обнаружения QTLs. Главными из них являются генетические свойства QTLs, контролирующих признак, факторы окружающей среды, размер популяции и экспериментальные ошибки (Churchill et al., 1994). Для QTL анализа очень важно четкое проявление исследуемого признака. Как говорилось выше, процесс цветения находится под контролем сложной сети генов, которую запускают каскады сигналов внешней среды. Пути, по которым передаются эти сигналы, перекрываются и сложным образом взаимодействуют. Таким образом, факторы окружающей среды и их изменение определяют выбор пути передачи сигнала, запускающего определенные стадии процесса цветения. Главными источниками экспериментальных ошибок являются ошибки при генотипировании растений с помощью маркеров и/или фенотипические изменения. Ошибки генотипирования или недостаток маркеров могут повлиять на расположение маркеров на карте сцепления. Полиморфные маркеры не всегда равномерно распределены вдоль хромосомы, они часто образуют кластеры в одних местах и отсутствуют в других. В дополнение к неравномерному распределению маркеров, частота рекомбинаций неодинакова вдоль хромосом. Недостаток маркеров или высокая гетерогенность исследуемых геномов могут привести к тому, что гены, связанные с QTLs исследуемого признака, не обнаруживаются при этом анализе. Особенности регистрации фенотипического изменения исследуемого признака имеют наибольшее значение для точного картирования QTLs. В целом, разрешение при картировании исследуемого признака определяется тремя показателями: плотностью маркеров, размером популяции и точностью оценки количественного признака (Collard et al., 2005).

В работах, указанных в табл. 1, условия проведения экспериментов с растениями арабидопсиса были различными: одни проводились в

искусственных условиях климатических камер и теплиц, другие в естественных природных условиях. Кроме того, в этих опытах исследовали экотипы из разных климатических зон произрастания. Лабораторные условия, в которых обычно выращивают растения *Arabidopsis*, могут не соответствовать тем условиям, в которых исследуемые экотипы находятся в привычных местах их обитания и, скорее, соответствуют крайнему положению на шкале вариации – в отличие от нормальных мест обитания, которые обычно гораздо прохладнее и суше (Hoffmann, 2002). Это сильно влияет на интерпретацию фенотипических различий между результатами, полученными в теплице, климатических камерах и на открытых площадках. Кроме того, когда растения выращивают в климатических камерах или теплицах, воспроизводя там природные условия роста, а затем пересаживают на открытые площадки, можно обнаружить QTLs, которые не были найдены, когда растения выращивали при постоянных условиях внешней среды (Weigel, 2012). Например, различные популяции *A. lyrata* зацветали в разное время в климатических камерах, однако после вернализации они зацветали одинаково рано. Вероятно, в естественных природных условиях растения подвергаются вернализации во время зимы, и разнообразие по времени зацветания, которое наблюдается в климатических камерах без вернализации, может не проявляться в природных условиях после первого вегетационного периода. Также возможно, что *FRIGIDA* оказывает плейотропное воздействие на другие признаки. Как известно, у растений *A. thaliana* *FRIGIDA* влияет не только на требование в вернализации, но и на эффективность использования воды (Kuittinen et al., 2008; McKay et al. 2003).

По мнению Brachi et al. (2010), проведение экспериментов, связанных с вернализацией, осложняется тремя причинами: (1) различные экотипы могут предъявлять разные требования к таким условиям вернализации, как температура, продолжительность воздействия холодом и стадия развития, на которой произошла вернализация; (2) возможен перезапуск экспрессии *FLOWERING LOCUS C*, когда во время вернализации в природных условиях

происходят скачки температур; (3) на уровень экспрессии *FLOWERING LOCUS C* влияют гены автономного пути. В естественных условиях, в которых проводились эксперименты Brachi и соавторов (2010), температура зимой не была постоянной. Возникают сложности при GWA анализе, если наблюдается высокая гетерогенность исследуемого гена в популяций. *FRIGIDA* является классическим примером аллельной гетерогенности в популяциях *A. thaliana* (Atwell et al., 2010). При всех своих преимуществах, GWA картирование генов, лежащих в основе изменения фенотипа, имеет существенные ограничения, когда сравниваются популяции из географически отдаленных регионов. Во-первых, сильное смешение в структуре популяций приводит к ложноположительным и ложноотрицательным результатам (Brachi et al., 2010). Во-вторых, при этом трудно обнаружить редкие аллели, потенциально важные для локальной адаптации (Atwell et al., 2010). В-третьих, притом что в природных популяциях один и тот же фенотипический признак может быть вызван разными аллелями одного и того же гена, аллельный полиморфизм может затруднить обнаружение геномных областей, связанных с фенотипической природной изменчивостью (Brachi et al., 2013b).

Несмотря на описание 13 нефункциональных аллелей *FRIGIDA* в популяциях *A. thaliana*, собранных во Франции (Le Corre et al., 2002; Le Corre 2005), в последующих исследованиях Brachi и соавторов ген *FRIGIDA* соответствовал QTL признака цветения среди французских картирующих популяций и местных французских природных популяций *A. thaliana*. Существует две гипотезы, с помощью которых можно объяснить этот результат. Первая гипотеза предполагает, что один из нефункциональных аллелей может доминировать над другим, нефункциональным аллелем. Вторая, полиморфизмы *FRIGIDA* могут быть разделены между несколькими нефункциональными аллелями (Brachi et al., 2013b). Точно так же в опытах с рапсом (Raman et al., 2013), QTL анализ показал, что время перехода к цветению – это сложный признак, который контролируется, по меньшей мере

Таблица 1. Анализ связи гена *FRIGIDA* со временем перехода растений *Arabidopsis* к цветению

Публикации	Объект исследования	Условия эксперимента	Широтный клин	Методы ассоциации гена <i>FRIGIDA</i> с временем цветения	Аллельное разнообразие гена <i>FRIGIDA</i>	QTLs времени цветения
Koornneef et al. 1998	Модельные экотипы <i>A thaliana</i>	Климатические камеры	Нет данных	QTL анализ	Нет данных	да
Johanson et al, 2000	Модельные экотипы <i>A thaliana</i>	Климатические камеры	да	Молекулярные маркеры (SCAR,)	да	
Shindo et al., 2005	Природные экотипы <i>A thaliana</i> , собранные в широтном интервале 15-65 °N	Теплицы	да	Молекулярные маркеры (SCAR,)	да	Нет данных
Stinchcombe et al., 2004	Европейские и Средиземноморские природные экотипы <i>A thaliana</i>	Природные условия	да	Молекулярные маркеры (SCAR,)		Нет данных
Stinchcombe et al., 2005	Европейские природные экотипы <i>A thaliana</i>	Климатические камеры	да	Молекулярные маркеры (SCAR,)	да	Нет данных
Le Corre et al., 2002	Природные популяции <i>A. thaliana</i> из Западной Европы	Теплицы с естественным освещением	да	Молекулярные маркеры (SCAR,)	да	Нет данных
Le Corre et al., 2005	Природные популяции <i>A. thaliana</i> из Франции	Теплицы с естественным освещением	нет	Молекулярные маркеры (RFLP, SNP, InDel, SCAR), секвенирование	да	Нет данных
Kuittinen et al., 2008	Популяции <i>A. lyrata</i> из центральной и северной Европы	Климатические камеры	да	Молекулярные маркеры (SCAR,), трансформация <i>A thaliana</i>	да	Нет данных
Brachi et al., 2010: Brachi et al., 2013a	Рекомбинантные линии и природные популяции <i>A. thaliana</i> , собранные со всего мира	Природные условия	да	GWA и QTL анализ	Нет данных	нет
Brachi et al., 2013b	Природные популяции <i>A. thaliana</i> из Франции и картирующие популяции	Природные условия	Нет данных	GWA и QTL анализ	Нет данных	да
Grillo et al., 2013	Природные популяции центральной Италии и центральной Швеции	Климатические камеры	Нет данных	SSR и QTL анализ	Нет данных	нет

20 различными локусами, локализованными на десяти хромосомах. И тем не менее, на эти локусы приходится не более 30% дисперсии по признакам начало цветения и ответ на вернализацию. Некоторые QTLs для времени зацветания несут хорошо известные гены вернализации *VERNALISATION INSENSITIVE 3* и *FLOWERING LOCUS C*, однако среди них не найден ген *FRIGIDA*, расположенный на той же хромосоме А3.

Помимо полиморфизма последовательностей генов, существует эпигенетический полиморфизм *FRIGIDA* и *FLOWERING LOCUS C*. Для *A. thaliana* показано наличие дифференциально метилированных регионов (differentially methylated regions, DMRs), которые выступают в качестве эпигенетических локусов количественных признаков (QTL^{epi}) и составляют 60-90% от наследования для двух сложных признаков, время перехода к цветению и длина первичного корня. Такие DMRs также определяют природное разнообразие популяций *A. thaliana* по признаку времени зацветания, независимо от изменений последовательностей ДНК (Cortijo et al., 2014). Несмотря на несомненно важную роль в регуляции перехода к цветению, ген *FRIGIDA*, в силу всех вышеописанных причин, может не обнаруживаться в QTLs признака времени цветения.

1.9. SCAR маркеры как инструмент для выявления полиморфизма, различия и идентификации геномов *Brassica*

ДНК маркеры являются генетическими инструментами, позволяющими решать самые разнообразные задачи. Их используют для генотипирования, установления родства и эволюционных связей между организмами и их таксонами, картирования генов и признаков. ДНК маркеры широко применяются при межвидовой гибридизации и интрогрессивной селекции для создания новых сортов рапса, сурепицы и капусты. Эффективность селекции значительно возрастает при использовании ДНК маркеров, позволяющих следить за интрогрессией фрагментов генома и оценивать внутривидовой полиморфизм для идентификации ценных аллелей и локусов.

В качестве таких ДНК маркеров на сегодняшний день наиболее часто используются SCAR маркеры (Sequence Characterised Amplified Region). SCAR маркеры – фрагменты ДНК, амплифицируемые со специфичными ПЦР праймерами, сконструированными на основе клонированных фрагментов целевого гена с известной нуклеотидной последовательностью. Основными преимуществами SCAR маркеров являются простота тестирования, наличие единственного фрагмента, а, следовательно, однозначность интерпретации, возможность автоматизации протокола. Недостатком SCAR маркеров является сложная процедура создания маркеров, включающая этапы клонирования и секвенирования генов или других фрагментов генома, особенно в тех случаях, когда в базах данных нет достаточного количества нуклеотидных последовательностей целевых фрагментов ДНК.

1.10. Обзор патентов, связанных с практическим использованием генов развития

Активное изучение генов, контролирующих процессы развития, у разных видов растений, позволило использовать эти гены для создания трансгенных форм культурных растений с улучшенными свойствами. Постоянно появляются новые технологии создания генетических конструкций, векторов, молекулярных маркеров, пригодных для использования при трансформации растений с целью улучшения их хозяйственно ценных характеристик. Эти сорта и технологии их получения имеют коммерческую ценность, и поэтому авторы стремятся защитить их от несанкционированного использования при помощи патентования. Растущее число патентов, выданных на такие объекты, свидетельствует о практической значимости исследований, направленных на изучение генов развития. Ниже приведены примеры патентов, полученных за последние десять лет в области, связанной с генно-инженерными применениями генов развития растений (табл. 2).

Таблица 2. Патенты на изобретения, связанные с практическим использованием генов развития растений.

№ патента	Автор	Год выдачи	Ген	Краткое содержание
CN102912027 A	Китай	2013	<i>VRN1</i>	Система праймеров для идентификации гена вернализации пшеницы <i>VRN-1</i> и ее применение.
EP2426205 A1	Prat et al., США	2012	<i>SP6A</i>	Создание генетических конструкций, несущих ген <i>SP6A</i> (гомолог <i>FT A. thaliana</i>), с целью регулирования клубнеобразования картофеля.
WO2008096969 A1	Ahn Ji Hoon Mei et al., Китай	2008	<i>SVP</i>	Метод регулирования времени цветения растений, происходящих от <i>Arabidopsis</i> с использованием векторной конструкции, содержащей ген <i>SVP</i> .
WO2007036045 A1	Yong-Mei et al., Китай	2007	<i>AtMBD9</i>	Метод регулирования времени цветения и ветвления растений, связанный с контролем экспрессии гена <i>AtMBD9</i> у <i>Nicotiana tabacum</i> .
6,828,478	Yanofsky et al., США	2004	<i>API</i>	Способ изменения скорости перехода к цветению путем введения в растение <i>Arabidopsis</i> дополнительных копий <i>API</i> .
6,713,663	Weigel et al., США	2004	<i>FT</i>	Сверхэкспрессия гена <i>FT</i> приводит к ускоренному переходу к цветению у различных видов растений

1.11. Заключение и постановка задач диссертационной работы

Значительный прогресс в изучении генетики цветения растений достигнут преимущественно на основании исследований модельных растений *A. thaliana*, а также нескольких культурных злаков. Охарактеризовано множество генов, контролирующих процесс цветения, и показаны пути их взаимодействия. Несмотря на несомненные успехи в исследовании генетических путей, контролирующих переход растений от вегетативного к репродуктивному развитию, многие стороны этого процесса остаются еще недостаточно изученными. Информация о молекулярных механизмах регуляции цветения растений постоянно пополняется новыми данными. Так, структурные гомологи генов цветения *A. thaliana* были найдены и у многих других видов растений, однако сведения об их функциях

по большей части носят отрывочный характер. Для сельскохозяйственных культур изучение полиморфизма генов цветения и связи этого полиморфизма с фенотипическими характеристиками может оказаться важным с практической точки зрения, поскольку признаки, связанные с временем перехода к цветению у различных жизненных форм растений, являются одной из важнейших точек приложения селекции.

Исходя из концепции генов-кандидатов, мы выбрали в качестве основной задачи нашего исследования анализ гомологов гена *FRIGIDA*, во многом определяющего разнообразие во времени цветения у *A. thaliana*. и провели выделение и сравнительный анализ последовательностей *FRIGIDA* из геномов шести культурных видов *Brassica*. Несмотря на большое экономическое значение культурных видов *Brassica*, ген *FRIGIDA* недостаточно изучен у этих растений. В работах Wang et al. (2011) и Irwin et al. (2012), опубликованных в период выполнения нашего исследования, были охарактеризованы последовательности гена *FRIGIDA* у *B. oleracea* и *B. napus*, ассоциированные со временем перехода к цветению. С учетом этих публикаций, нашими первоочередными задачами было исследование последовательностей гена *FRIGIDA* у остальных видов *Brassica*, представленных в треугольнике U, прежде всего, у *B. rapa*, и сопоставление наших результатов с данными Wang et al. (2011) и Irwin et al. (2012) в более широком контекста эволюции рода *Brassica* и эколого-географических особенностей регуляции перехода к цветению у этих растений.

Мы ожидали, что сравнительный анализ последовательностей гена *FRIGIDA* из геномов и субгеномов А, В и С у культурных видов *Brassica* позволит выявить локус- и геном-специфичные полиморфизмы. Изучение полиморфизмов *FRIGIDA* необходимо для создания специфичных маркеров, которые могут использоваться для уточнения связи этого гена с QTL времени перехода к цветению и для интрогрессивной селекции культурных видов *Brassica*, в том числе на время зацветания и скороспелость.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Семена растений *Brassica* были получены из коллекций Centre for Genetic Resources, Вагенинген, Нидерланды (CGN), Warwick Horticulture Research International, Уеллесборн, Великобритания (GK) и ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С. Петербург (ВИР). Семена проращивали два дня на влажной фильтровальной бумаге и затем высаживали в почву. Растения выращивали при комнатной температуре при постоянном освещении под лампами OSRAM Circolux EL (24W).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение геномной ДНК из тканей растений

Геномную ДНК выделяли из свежесобранных листьев с помощью набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.2. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.3. Определение концентрации нуклеиновых кислот

Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при 260 нм на NanoPhotometer P 300 (IMPLEN, Germany). Качество выделения и чистоту нуклеиновых кислот определяли по отношению OD_{260}/OD_{280} . Оптимальное отношение должно равняться 1.8 – 2.0.

2.2.4. Амплификация фрагментов геномной ДНК

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе DNA Engine PTC 200 (Bio-Rad, США) по следующим программам. Амплификацию полноразмерных последовательностей гена *FRIGIDA* осуществляли по программе: 1 цикл 30 с при 94°C; 30 циклов 30 с при 62°C,

3 мин 30 с при 72°C; один цикл 15 мин при 72°C. Для амплификации специфичных фрагментов гена *FRI* использовали следующую программу: 1 цикл 30 с при 94°C; 30 циклов 30 с при 58°C, 2 мин при 72°C; один цикл 15 мин при 72°C. Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала: 10x PCR буфер, 2 mM MgCl₂, 100 нг геномной ДНК, 0.2 mM dNTP, 1 mM прямого and 1 mM обратного праймеров, и 1 U *Taq*-ДНК полимеразы (Fermentas, Germany) или 2,5 U *Pfu*-полимеразы (Fermentas).

При анализе большого числа образцов готовили общую реакционную смесь, включающую все компоненты, кроме ДНК. Для каждой ПЦР - реакции составлялся протокол, в котором указывалось общее количество всех компонентов реакционной смеси, исходя из расчета на одну реакцию (образец). Количество праймера, идущего на одну реакцию рассчитывали исходя из его концентрации (пмоль/мл). Для проверки чистоты компонентов реакционной смеси ставили контроль, в который вместо ДНК добавляли воду (отрицательный контроль). Далее помещали пробирку в амплификатор и проводили ПЦР по заданной программе в зависимости от условий проведения реакции (температуры отжига праймеров и времени элонгации).

2.2.5. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК

Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 0,8 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия: в гели объёмом 100 мл добавляли 1 мкл раствора бромистого этидия (10 мг/мл). Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли с помощью маркеров Gene Ruler 1kb DNA Ladder (“Promega”, США) и Gene Ruler 1kb plus DNA Ladder (“Promega”, США).

Рабочие растворы:

1) 1×ТАЕ-буфер. К 20 мл 50×ТАЕ добавляли 980 мл дистиллированной воды. Раствор повторно использовали не более 5 раз и хранили при 4-6°C до 2 недель.

2) 0,8% агарозный гель. 0,8 г агарозы разводили в 100 мл 1% ТАЕ буфера, нагревали до полного и равномерного расплавления геля.

3) 50×ТАЕ-буфер. 242 г трис-НСl, 57 мл ледяной уксусной кислоты, 18,6 г ЭДТА, рН 8,0 растворяли в литре воды.

Агарозный гель нагревали до полного и равномерного расплавления. Раствор охлаждали до 55-60 °С, добавляли бромистый этидий (1 мкл на 100 мл) и заливали в кювету площадью 60×80 мм. Для создания стартовых лунок в кювету ставили гребенку с зубцами 1×4 мм. Полимеризация агарозы происходила при температуре ниже 42 °С. Агарозный гель помещали в камеру для электрофореза, камеру заливали 1% ТАЕ буфером так, чтобы гель был полностью покрыт буфером. Смешивали пробы с красителем и вносили их микропипеткой в лунки геля под электрофорезный буфер. В отдельную лунку вносили маркер молекулярного веса, с помощью которого определяли размеры амплифицированного фрагмента. Электрофорез осуществлялся при напряжении электрического поля 6–7 В/см.

Спектры фрагментов ДНК регистрировали в ультрафиолете (длина волны 312 нм) с помощью цифровой системы Biotest (“Биоком”, Россия) и Gel Logic 100 Imagyng System (Eastman Kodak, США).

2.2.6. Клонирование амплифицированных фрагментов ДНК

Для накопления клонируемого фрагмента ДНК проводили амплификацию целевой нуклеотидной последовательности из геномной ДНК с использованием специфичных праймеров. Затем продукты ПЦР подвергали электрофоретическому разделению в агарозном геле. Разделённые фрагменты вырезали из геля под ультрафиолетом при длине волны 254 нм и элюировали из геля, используя набор QiaQuick Gel Purification Kit (Qiagen, США), согласно протоколу фирмы-производителя. Очищенные фрагменты ДНК лигировали с помощью наборов PCR Cloning Kit InsTAclone™ с использованием вектора pTZ57R/T и CloneJet PCR Cloning Kit с использованием вектора pJet (Fermentas) согласно протоколам фирмы-производителя. Трансформацию клеток лабораторного штамма *E. coli* JM109 производили с использованием набора TransformAid (Fermentas, Литва).

Трансформированные клетки высевали на твердую LB-среду, содержащую селективные агенты. Отбор клонов, полученных с использованием вектора pTZ57R/T, осуществляли с помощью бело-голубой селекции на среде, содержащей ИПТГ (изопропил-β-тио-галактозид), X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид) в качестве индуктора и ампициллин. Отбор клонов, полученных с использованием вектора pJet, осуществляли на селективной среде с антибиотиком ампициллином. Полученные первичные клоны, которые предположительно содержали вставку, были подвергнуты скринингу посредством ПЦР. Амплификацию осуществляли с парами праймеров M13 и pJET, фланкирующими место вставки целевого фрагмента в векторах pTZ57R/T и pJet, соответственно. После скрининга, отобранные колонии *E. coli*, содержащие вектор со вставкой целевого фрагмента, культивировали в жидкой LB-среде. Из полученной культуры клеток была выделена плазмидная ДНК и секвенирована.

2.3 Методы биоинформатики

Поиск гомологов гена *FRIGIDA* осуществляли в базах данных NCBI GenBank (Nucleotide, EST, GSS и SRA), BRAD (<http://brassicadb.org/brad>; *B. rapa* BGI scaffolds v. 1.0) и INRA Brassica.FR (<http://www.brassica.fr>; 454-reads database) с использованием программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для подбора и оптимизации ПЦР праймеров были использованы следующие программы: NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Lasergene 7.0 (<http://www.dnastar.com>) и Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools>). Подбор специфичных праймеров для проведения ПЦР проводили вручную на основании анализа множественных выравниваний с последующей оптимизацией термодинамических свойств каждого олигонуклеотида с помощью программы Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools>). Для филогенетического анализа использовали алгоритм Maximum Likelihood в пакете MEGA5 (Tamura et al., 2011). Для определения экзон-интронной структуры использовали алгоритм

FGENSH (<http://mendel.cs.rhul.ac.uk/mendel.php?topic=fgen>) Аминокислотные последовательности транслировали с использованием программы ExPASy Translate tool (<http://web.expasy.org/translate>). Для распознавания характерных доменов белка FRIGIDA использовали базу данных Pfam. version 24.0 (<http://pfam.janelia.org/search/sequence>) с соответствующей программой поиска, а для предсказания биспиральных структур - программу COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Для анализа полиморфизма последовательностей ДНК использовали пакет DnaSP 5.10.1 (Rozas et al., 2010).

2.4. Номенклатура маркеров.

В соответствии с номенклатурой, принятой для геномов *Brassica* (Ostergaard., King, 2008), маркер обозначается сокращением BrX.Fri.Y, где Br – вид *Brassica*, X (геном А, В или С) – геномная специфичность маркера; А – геноспецифичность маркера, Y – локусная специфичность маркера. Так, маркер BrA.FRI.a специфичен для локуса *FRI.a* из генома *A. B. rapa*.

2.5. Регистрация последовательностей ДНК в базу данных GenBank NCBI

Для регистрации нуклеотидных последовательностей фрагментов генов в GenBank NCBI использовали программу BankIt, доступную на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>). Все зарегистрированные нами последовательности гена *FRIGIDA* представлены в Приложении.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Поиск гомологов гена-прототипа *FRIGIDA A. thaliana* в генетических базах данных

Для выделения и структурного анализа последовательностей гомологов *FRIGIDA* в геномах *Brassica* мы использовали метод генов-кандидатов. В качестве гена-прототипа мы выбрали функциональный ген *FRIGIDA* из *A. thaliana* поздноцветущего экотипа Н51 (NCBI GenBank accession number AF228499). Первым этапом выявления гомологов гена *FRIGIDA* в геномах *Brassica* и их выделения был поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных гену *FRIGIDA A. thaliana*, в базах данных NCBI Genbank, BRAD (<http://brassicadb.org/brad>) и French *Brassica rapa* (<http://www.brassica.fr>) с помощью алгоритма BLAST. По состоянию на начало мая 2011, Генбанк NCBI содержал всего четыре последовательности, аннотированные как гомологи *FRIGIDA* из *B. rapa* (геном А; AY176673, EU700362, HQ615935) и *B. oleracea* (геном С; DQ503574), гомологичные последовательности *B. nigra* (геном В) отсутствовали.

3.2. Поиск и первичный анализ полноразмерных гомологов *FRIGIDA* из генома А с помощью методов *in silico*

В базе данных BRAD (подраздел Scaffolds v. 1.0) (<http://brassicadb.org/brad/blastPage.php>), содержащей полный геном дигиплоидной формы *B. rapa ssp. pekinensis* Chifu, были обнаружены два скаффолда (BGIScaffold000064 и BGIScaffold000108), содержащих гомологи гена *FRIGIDA*, условно названные *FRI.a* и *FRI.b*, с открытой рамкой считывания длиной 2178 и 2062 п.н., соответственно. В базе данных French *Brassica rapa* мы нашли большое число фрагментов генома *B. rapa* Chifu (454 последовательности), которые были собраны в контиги, гомологичные на 100% локусам *FRI.a* и *FRI.b*, выделенным из скаффолдов. Следует отметить, что в геноме дигиплоидной формы *B. rapa* гомологи *FRI.a* и *FRI.b* найдены в

скаффолдах, картированных на хромосомах A3 и A4, соответственно. На этом основании мы определили *FRI.a* и *FRI.b* как паралогичные локусы. Таким образом, мы впервые обнаружили, что ген *FRI* представлен в геноме диплоидного вида двумя локусами. Степень гомологии локусов *FRI.a* и *FRI.b* из *B. rapa* Chifu с геном-прототипом из *A. thaliana* H51 составила, соответственно, 75 и 64%. Между собой *FRI.a* и *FRI.b* одного и того же растения сходны на 81%; их различия вызваны множественными нуклеотидными заменами и инделами (рис. 12).

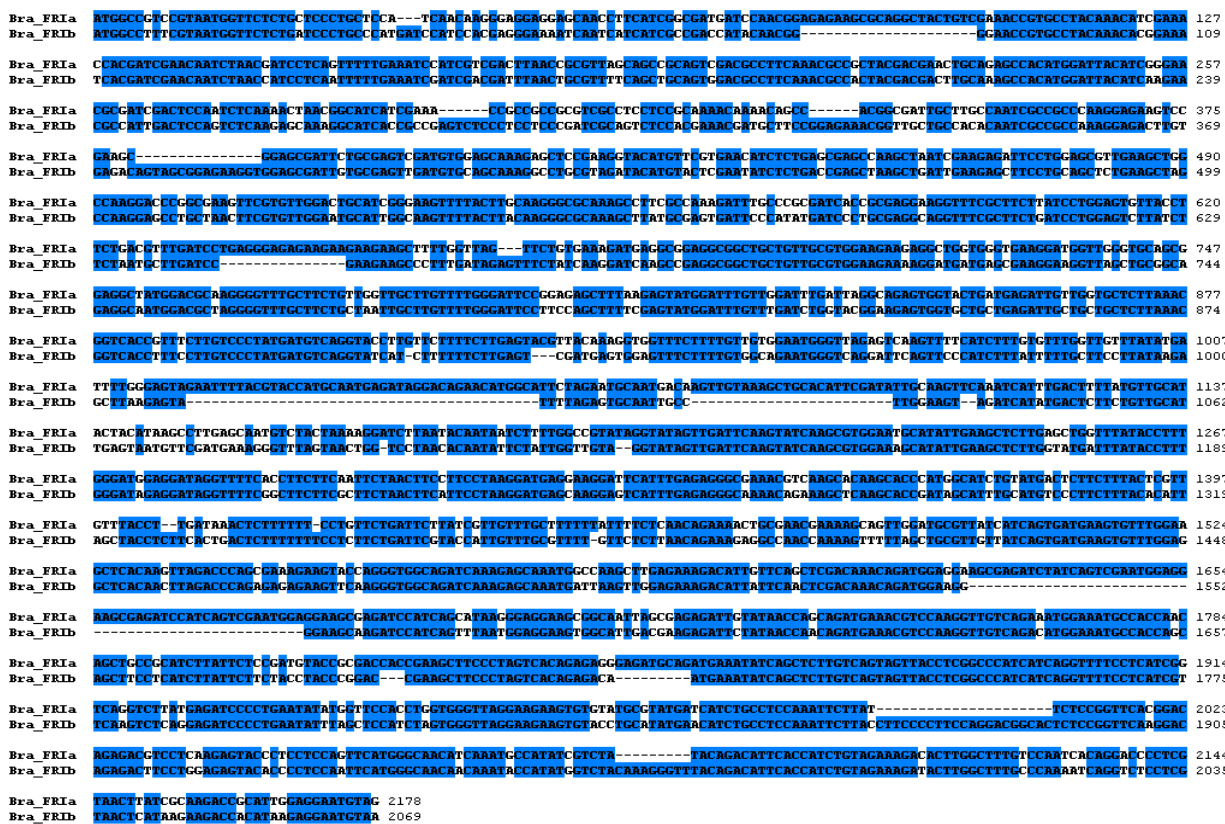


Рис. 12. Выравнивание нуклеотидных последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* из *B. rapa* Chifu. Синей заливкой выделены инделы и гомологичные области локусов гена *FRIGIDA*. Bra_FR1a – нуклеотидная последовательность локуса *FRI.a*; Bra_FR1b - нуклеотидная последовательность локуса *FRI.b*.

BLAST поиск в базе данных Генбанк NCBI (подразделы Core Nucleotide, GSS и EST) обнаружил неаннотированный фосмидный клон *B. rapa* Chifu (AC240938), содержащий полноразмерную последовательность

FRIa (100% гомологии с ранее идентифицированной последовательностью *FRIa*), а также множество анонимных EST и GSS последовательностей из *B. rapa*, *B. oleracea* и *B. napus*, гомологичных локусам *FRIa* и *FRI.b*. В базе данных French *Brassica rapa* мы нашли большое число фрагментов генома *B. rapa* Chifu, которые были собраны в контиги, гомологичные на 100% нами выделенным *in silico* ранее локусам *FRI.a* и *FRI.b*. Эти данные служат независимым подтверждением надежной идентификации нуклеотидной последовательности *FRI.a* и *FRI.b* в этом виде *Brassica*. Присутствие последовательностей *B. rapa* и *B. oleracea*, гомологичных локусам *FRI.a* и *FRI.b*, в базах данных EST в Генбанке NCBI указывает на то, что оба локуса транскрибируются.

Для определения экзон-интронной структуры полученных *in silico* локусов *FRI.a* и *FRI.b* *B. rapa* Chifu, а, следовательно, для предсказания первичной структуры процессированных транскриптов, мы использовали три метода: (1) выравнивание экзонов *FRIGIDA* арабидопсиса с последовательностями *FRIGIDA Brassica*; (2) сравнение геномных последовательностей *FRIGIDA Brassica* с гомологичными EST (мРНК) последовательностями, извлеченными из базы данных Генбанка NCBI; (3) предсказание структуры гена *FRIGIDA* с помощью алгоритма FGNSH. Во всех трех случаях полученные результаты указывают на то, что локусы *FRI.a* и *FRI.b* из *B. rapa* Chifu имеют сходную с арабидопсисом экзон-интронную структуру – три экзона и два интрона. Однако экзон-интронную структуру локуса *FRI.b* из *B. rapa* Chifu точно установить не удалось, так как использованные нами методы давали разные результаты. Сравнение нуклеотидной последовательности *FRI.b* *B. rapa* Chifu (геном А) с EST последовательностью из *B. rapa* Chifu (EX058676) свидетельствовало об образовании укороченных транскриптов *FRI.b*. Для локуса *FRI.b* Chifu алгоритм FGNSH предсказывает структуру, наиболее отличающуюся от ожидаемой. Мы обнаружили мутацию донорного сайта сплайсинга (моноклеотидная замена GT → GC); как свидетельствует структура,

предсказанная сравнением с EST последовательностью, эта мутация может приводить к нарушению сплайсинга и образованию укороченных транскриптов *FRI.b* Chifu. Предполагаемые транскрипты *FRI.a* и *FRI.b*

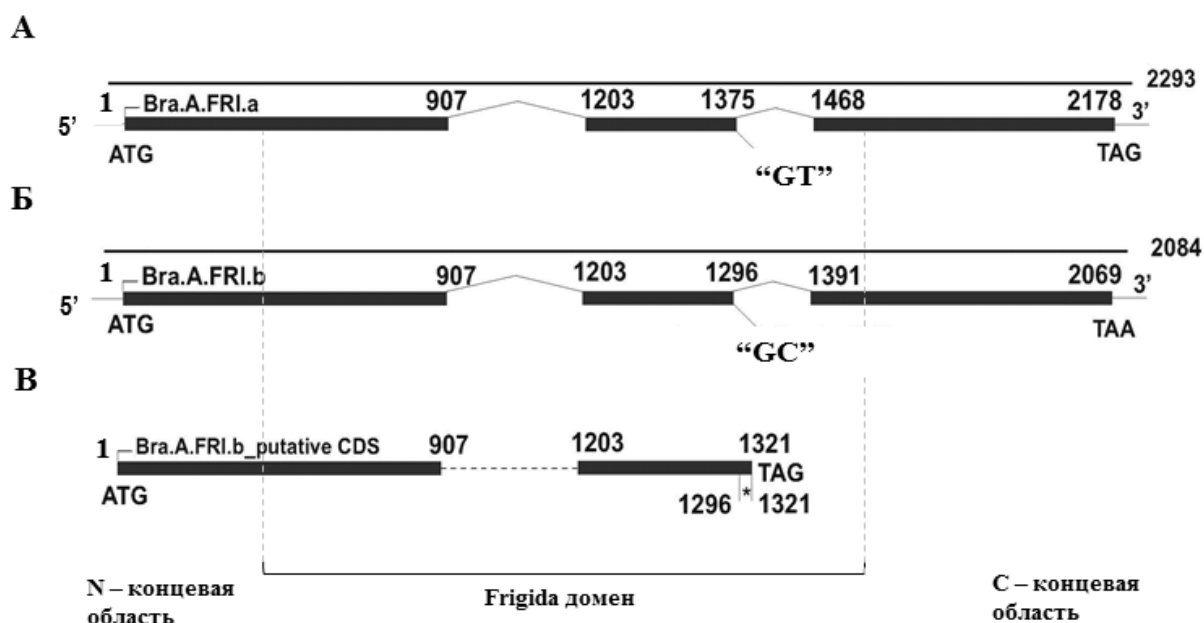


Рис. 13. Экзон-интронная структура локусов *FRI.a* и *FRI.b* из *B. rapa* Chifu. (А) экзон-интронная структура локуса *FRI.a* *B. rapa* Chifu; (Б) экзон-интронная структура локуса *FRI.b*; *B. rapa* Chifu; (В) экзон-интронная структура предполагаемого укороченного транскрипта локуса *FRI.b* *B. rapa* Chifu; ATG и TAG, TAA – старт и стоп-кодоны, соответственно. Цифрами обозначены границы экзонов и интронов. “GT” – донорный сайт сплайсинга, “GC” – акцепторный сайт сплайсинга. Экзоны обозначены черными прямоугольниками, интроны – сплошной линией.

кодируют белки размером 596 и 576 а.о., соответственно. Предполагаемому укороченному транскрипту *FRI.b* соответствует белок длиной 366 а.о.. Для аминокислотных последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* из *B. rapa* Chifu определен центральный консервативный домен Frigida и предсказано образование coiled-coil домена в С-концевой области.

3.3. Клонирование гомологичных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А, С и В *Brassica*

3.3.1. Создание и верификация локус-специфичных праймеров для клонирования *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А и С *Brassica*

Чтобы клонировать *FRI.a* и *FRI.b* из геномов *Brassica* А и С, понадобились локус-специфичные праймеры, Для этого мы провели множественное выравнивание гомологичных нуклеотидных последовательностей *FRIGIDA*, найденных в базах данных.

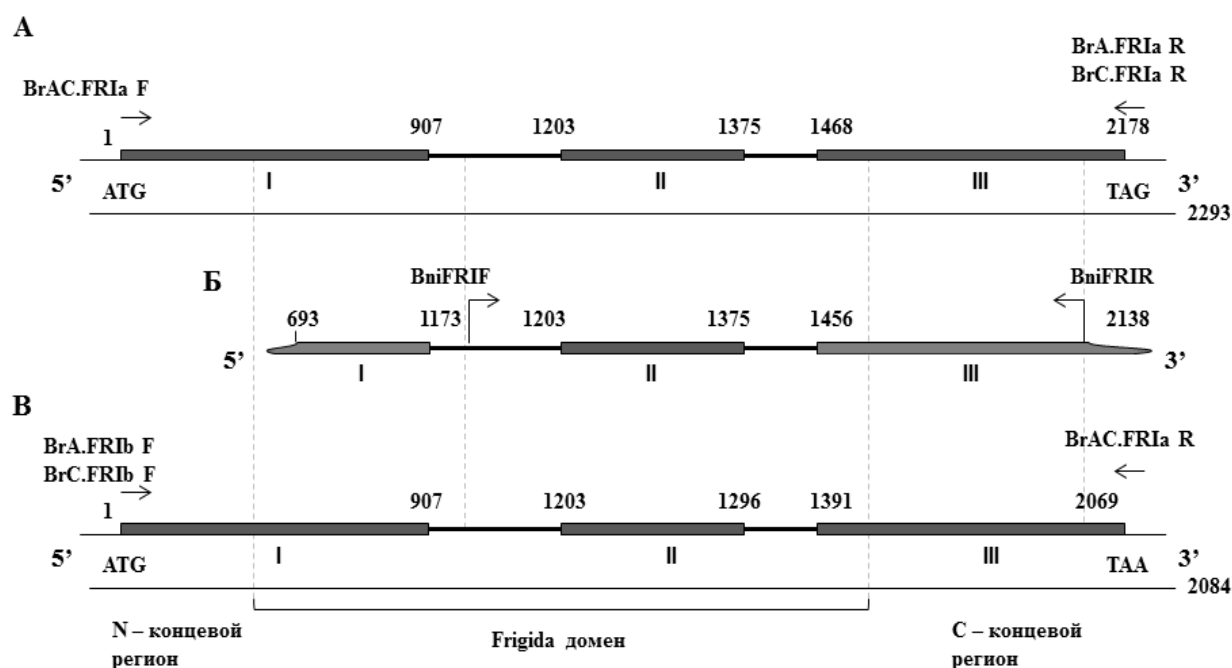


Рис. 14. Положение локус-специфичных праймеров для амплификации *FRI.a* и *FRI.b* из геномов *Brassica* А и С. 1 – положение старт-кодона, 2178 и 2069 – положение стоп-кодона. Интроны обозначены сплошной черной линией. Черными прямоугольниками обозначены экзоны. I, II и III – первый, второй и третий экзон, соответственно. Стрелками показано расположение и направление праймеров. Цифрами обозначены границы интронов и экзонов

На основании консервативных последовательностей, специфичных для определенных локусов и геномов *FRIGIDA*, мы сконструировали четыре пары праймеров, различающих локусы *FRI.a* и *FRI.b* в геномах А и С. Геном-

специфичные праймеры подбирали таким образом, чтобы получать SCAR маркеры, соответствующие полноразмерным последовательностям локусов *FRIGIDA* и пригодные для последующего функционального анализа. Прямые праймеры подобраны к началу кодирующей области, начиная со стартового кодона, обратные – к фрагменту 3' нетранслируемой области гена. Таким образом, праймеры фланкируют полноразмерную последовательность гена *FRIGIDA*. (табл. 3, рис. 14).

Таблица 3. Праймеры для амплификации последовательностей гена *FRIGIDA* из геномов А, В и С *Brassica*

Локус	Геном	Праймер	5' – 3' последовательности праймеров	Темп. отжига, °С	Размер ампликона, п.н.	
<i>BraA.FRI.a</i>	А	BrAC.FRIaF	ATCCCCAATGGCCGTCGG	62	~2500	
		BrA.FRIa R	AAGCTTCTGCTTGTTAAGCCC			
<i>BolC.FRI.a</i>	С	BrAC.FRIaF	ATCCCCAATGGCCGTCGG			
		BrC.FRIaR	GATCCTAAGCTTTGTGTTTATTA AATAA			
<i>BraA.FRI.b</i>	А	BrA.FRIbF	CCCATGGCCTTTCGTAATGG		~2100	
		BrAC.FRIbR	CCTTTGTTACA W W T T T T T T A C A T T CCTC			
<i>BolC.FRI.b</i>	С	BrC.FRIbF	CCCATGGCCTTCCGTAATG			
		BrAC.FRIbR	CCTTTGTTACA W W T T T T T T A C A T T CCTC			
<i>BniB.FRI</i>	В	BrB.FRI F	GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAA		58	~1400
		BrB.FRI R	TCCTGTGATTGGACAAAGCCAA GT			

Примечание: WW соответствует AT/AA

Для верификации сконструированных праймеров была проведена ПЦР. В качестве матрицы брали геномную ДНК растений *B. rapa* и *B. oleracea*. Наличие целевых фрагментов размером около 2500 и 2200 п.н., соответствующих локусам *FRI.a* и *FRI.b*, было выявлено во всех исследованных образцах растений *Brassica* (рис. 15).

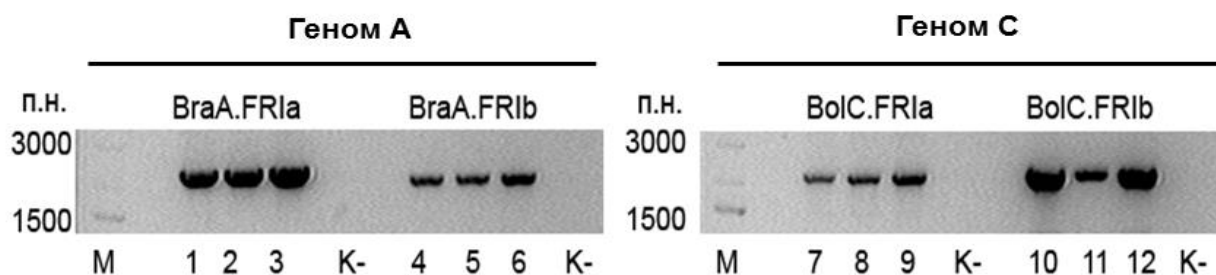


Рис. 15. Верификация локус-специфичных праймеров для амплификации *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А и С *Brassica*. М – маркер молекулярной массы, К- - отрицательный контроль (вода), п.н. – пара нуклеотидов, 1, 2, 4, 5 - *B. rapa* ssp. *campestris*, 3, 6 – *B. rapa* var. *perviridis*, 7, 10 - *B. oleracea* var. *alboglabra* , 8, 11 – *B. oleracea* var. *italica*, 9, 12 – *B. oleracea* var. *sabellica*.

3.3.2. Клонирование полноразмерных последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А и С *Brassica*

Созданные нами специфичные праймеры были использованы для клонирования последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А и С *Brassica*. Для клонирования локуса *FRI.a* из *B. rapa* (геном А) использовали пару праймеров BrAC.FRIaF и BrA.FRIa R, для клонирования *FRI.a* из *B. oleracea* (геном С) - BrAC.FRIaF и BrC.FRIaR, для клонирования *FRI.b* из *B. rapa* - BrA.FRIbF и BrAC.FRIbR и для клонирования *FRI.b* из *B. oleracea* – праймеры BrC.FRIbF и BrAC.FRIbR.

Для изучения аллельного разнообразия мы определили нуклеотидную последовательность пяти клонов для каждого локуса *FRIGIDA*. При определении гаплотипов локусов *FRIGIDA* мы учитывали только те полиморфизмы, которые обнаруживались, как минимум, в двух из пяти секвенированных клонов. Все клонированные формы содержали по одному гаплотипу локусов *FRI.a* и *FRI.b*. В пределах одного генома аллели *FRIGIDA* были сходны на 95-99%, тогда как между геномами А и С локусы *FRIGIDA* были сходны на 87-94%. Степень гомологии локусов *FRI.a* и *FRI.b* в пределах одного генома составляла 78-81%, а между геномами А и С – 63-80%. Таким образом, дублированные локусы *FRIGIDA* в пределах одного генома различаются сильнее, чем один и тот же локус *FRIGIDA* в разных

геномах (*rapa FRI.a* vs. *oleracea FRI.a*; *rapa FRI.b* vs. *oleracea FRI.b*). Полученные данные позволяют утверждать, что локусы *FRI.a* в геномах А и С являются структурными ортологами; в равной мере это верно и для локуса *FRI.b*. Следует отметить, что последовательности локусов *FRIGIDA* из *B. rapa* Chifu, клонированные нами и извлеченные из баз данных, совпадали на 100%. Полное совпадение нуклеотидных последовательностей локусов *FRIGIDA* *B. rapa* Chifu, полученных из трех независимых источников, свидетельствует о высокой точности идентификации нуклеотидных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* при использовании различных методов (выделение гена из скаффолдов, сборка контигов из коротких 454 последовательностей и клонирование гена из выделенной нами геномной ДНК).

Табл. 4. Последовательности локусов *FRIGIDA*, клонированные из *B. rapa* и *B. oleracea*, % сходства

Локусы	Локус <i>FRI.a</i>				Локус <i>FRI.b</i>		
	<i>B. rapa</i> (AA)		<i>B. oleracea</i> (CC)		<i>B. rapa</i> (AA)		<i>B. oleracea</i> (CC)
	JN015481	JN882592	JN989363	JN882594	JN015482	JN882593	JN882595
<i>BraA.FRI.a</i> Chifu	100	99	89	87	81	81	79
<i>BraA.FRI.a</i> PakChoi		100	88	88	80	75	79
<i>BolC.FRI.a</i> A12DH			100	95	80	80	79
<i>BolC.FRI.a</i> Frosty				100	63	80	78
<i>BraA.FRI.b</i> Chifu					100	98	94
<i>BraA.FRI.b</i> PakChoi						100	94
<i>BolC.FRI.b</i> Frosty							100

3.3.3. Создание и верификация ген-специфичных праймеров для амплификации консервативного участка гена *FRIGIDA* из генома *Brassica*

Для изучения гена *FRIGIDA* у *B. nigra* (геном BB) было необходимо разработать новую систему праймеров, специфичных для генома В. Из-за отсутствия в базах данных последовательностей *FRIGIDA* *B. nigra* мы не смогли подобрать праймеры на полноразмерную последовательность этого гена. Множественное выравнивание известных последовательностей *FRIGIDA* у Brassicaceae позволило выявить наиболее консервативные участки, которые могли сохраниться у *B. nigra* в ходе эволюции. На основании таких участков, присутствующих во всех последовательностях гена *FRIGIDA*, изолированных из Brassicaceae, была разработана и оптимизирована система праймеров, которые фланкируют фрагмент гена *FRIGIDA* длиной около 1400 п.н. (табл. 3). Этот фрагмент включает почти весь домен Frigida и большую часть С-концевой области (рис. 13). Эти праймеры позволяют амплифицировать целевой фрагмент гена *FRIGIDA* из всех геномов и локусов, но не являются геном и локус-специфичными. Для верификации разработанных праймеров была проведена ПЦР. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *B. nigra*, *B. rapa* и *B. oleracea*.

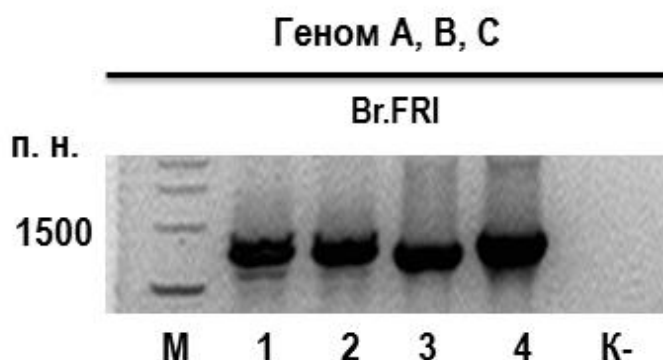


Рис. 16 Верификация ген-специфичных праймеров для амплификации фрагмента гена *FRIGIDA* из В генома. М – маркер молекулярной массы, К- - отрицательный контроль, п.н. – пара нуклеотидов, 1, 2, - *B. nigra*, 3 – *B. rapa*, 4 – *B. oleracea*.

3.3.4. Клонирование консервативного участка гена *FRIGIDA* из В генома *Brassica*

С использованием разработанных нами праймеров (табл. 3, рис. 13) были клонированы фрагменты гена *FRIGIDA* из *B. nigra*. Эти фрагменты были соотнесены с полученными нами ранее последовательностями локусов *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А и С *Brassica*, что позволило предварительно определить их как локусы *FRI.a* и *FRI.b*. Между собой *FRI.a* и *FRI.b* *B. nigra* сходны на 83%; их различия определяются множественными нуклеотидными заменами и инделами. Полученные таким образом фрагменты локусов *FRI.a* и *FRI.b* из *B. nigra* сильно отличаются от своих ортологов из геномов А и С *Brassica* (79-81 и 89-91% сходства, соответственно) (табл. 5).

Таблица 5. Последовательности локусов *FRIGIDA*, клонированные из *B. nigra*, % сходства.

Локусы <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> геномов А и С <i>Brassica</i>	Локус <i>FRI.a</i>		Локус <i>FRI.b</i>	
	<i>BniB.FRI.a</i> KF896288	<i>BniB.FRI.a</i> KF896289	<i>BniB.FRI.b</i> KJ649744	<i>BniB.FRI.b</i> KJ649745
<i>BraA. FRI.a</i> Chifu (AEJ81950)	80	80	84	84
<i>BraA. FRI.a</i> PakChoi (AFC68976)	81	81	83	83
<i>BolC. FRI.a</i> A12DH (AFC90010)	80	81	84	84
<i>BolC. FRI.a</i> Frosty (AFC68978)	79	79	82	82
<i>BraA. FRI.b</i> Chifu (AEJ81951)	74	75	89	89
<i>BraA. FRI.b</i> PakChoi (AFC68977)	74	76	89	89
<i>BolC. FRI.b</i> Frosty (AFC68979)	77	77	91	91

3.4. Клонирование гомологичных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* из субгеномов А, С и В *Brassica*

Для изучения последовательностей *FRIGIDA* в субгеномах А, С и В у аллотетраплоидных видов *B. carinata* (геном ВС) и *B. juncea* (геном АВ) мы клонировали нуклеотидные последовательности локусов *FRI.a* и *FRI.b* из этих видов с помощью системы праймеров, которые использовали для клонирования локусов *FRIGIDA* из диплоидных форм *Brassica* (табл. 3, рис. 13). Для амплификации *FRI.a* и *FRI.b* из субгенома А использовали пары праймеров BrAC.FRIaF и BrA.FRIaR, BrA.FRIbF и BrAC.FRIbR, а для субгенома С – пары BrAC.FRIaF и BrC.FRIaR, BrC.FRIbF и BrAC.FRIbR. Полученные нуклеотидные последовательности *FRI.a* и *FRI.b* на 96-99% сходны с ортологами из соответствующих геномов *B. rapa*, *B. oleracea* и *B. napus* (табл. 4). По своему строению локусы *FRI.a* и *FRI.b* у тетраплоидов не отличаются от локусов *FRI.a* и *FRI.b* в геномах А и С. Таким образом, последовательности гена *FRI* геномов А и С у диплоидов *B. rapa* и *B. oleracea* сохраняются с высокой степенью консерватизма в субгеномах А и С трех аллотетраплоидных видов: *B. carinata*, *B. juncea* и *B. napus*.

Для клонирования последовательностей *FRIGIDA* из субгеномов В тетраплоидных видов *B. carinata* (геном ВС) и *B. juncea* (геном АВ) использовали пару праймеров BrB.FRIF и BrB.FRIF. При клонировании с этой парой праймеров, помимо целевого фрагмента гена *FRIGIDA* из субгенома В, амплифицируются фрагменты локусов *FRI.a* и *FRI.b* субгеномов А и С. Поэтому для различения целевых последовательностей, проводили множественное выравнивание клонированных нуклеотидных последовательностей *FRIGIDA* и полученных ранее последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* из генома В и геномов и субгеномов А и С *Brassica*. Клонированные фрагменты *FRI.a* и *FRI.b* из субгеномов В *B. carinata* и *B. juncea*, сходны с последовательностями из *B. nigra* на 97 - 99% (табл. 6).

Табл. 6. Последовательности локусов *FRI.a* и *FRI.b*, клонированные из тетраплоидных видов *Brassica*.

Локусы <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> в диплоидных видах <i>Brassica</i>	Локус <i>FRI.a</i>				Локус <i>FRI.b</i>			
	Субгеном А	Субгеном С	Субгеном В		Субгеном А	Субгеном С	Субгеном В	
	<i>BjuA.FRI.a</i> (KC937068)	<i>BcaC.FRI.a</i> (KF896287)	<i>BjuB.FRI.a</i>	<i>BcaB.FRI.a</i>	<i>BjuA.FRI.b</i> (KJ649746)	<i>BcaC.FRI.b</i> (KJ145233)	<i>BjuB.FRI.b</i> (KJ145235)	<i>BcaB.FRI.b</i> (KJ145234)
<i>BraA.FRI.a</i> Chifu (AEJ81950)	99	87	76	77	70	67	81	82
<i>BraA.FRI.a</i> PakChoi (AFC68976)	98	87	76	77	70	67	83	82
<i>BolC.FRI.a</i> A12DH (AFC90010)	88	99	78	79	68	69	84	83
<i>BolC.FRI.a</i> Frosty (AFC68978)	85	95	78	79	68	67	82	82
<i>BraA.FRI.b</i> Chifu (AEJ81951)	62	67	76	77	99	92	89	89
<i>BraA.FRI.b</i> PakChoi (AFC68977)	55	60	76	77	99	91	88	89
<i>BolC.FRI.b</i> Frosty (AFC68979)	63	68	73	74	90	98	91	91
<i>BniB.FRI.a</i> (KF896288)	77	77	98	99	75	71	82	82
<i>BniB.FRI.b</i> (KJ649744)	72	74	76	77	88	88	97	99

3.5. Строение нуклеотидных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* в геномах и субгеномах *Brassica*

3.5.1. Экзон-интронная структура клонированных нами нуклеотидных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* *Brassica*

Определение экзон-интронной структуры клонированных последовательностей локусов *FRIGIDA Brassica* проводили двумя *in silico* методами: (1) выравнивание экзонов *FRIGIDA* арабидопсиса и локусов *FRIGIDA Brassica*, найденных *in silico*; (2) предсказание структуры транскрипта с помощью алгоритма FGESH.

Все полученные последовательности локусов *FRI.a* и *FRI.b* из геномов и субгеномов А и С *Brassica* имеют сходную с *A. thaliana* экзон-интронную структуру: три экзона и два интрона. Мутантный сайт сплайсинга во втором экзоне, как в случае с *FRI.b B. rapa* Chifu, был обнаружен только у последовательностей *FRI.b* из генома и субгеномов А.

Экзон-интронная структура полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов *FRI.a* и *FRI.b* из генома и субгеномов В *Brassica* была определена путем соотнесения ее с экзонами и интронами *FRI.a* и *FRI.b B. rapa* и *B. oleracea*. Полученные фрагменты длиной приблизительно 1400 п.н. полностью включают в себя второй экзон, оба интрона и части первого и третьего экзонов. Мутантный сайт сплайсинга во втором экзоне не был обнаружен.

3.5.2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* *Brassica*

Мы провели анализ нуклеотидного разнообразия полученных локусов *FRIGIDA Brassica* (рис. 17). Сравнительный анализ клонированных нами полноразмерных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* геномов и субгеномов *Brassica* показал, что в локусе *FRI.a* область первого интрона является наиболее вариабельной (79%), здесь наблюдается большое число видо- и

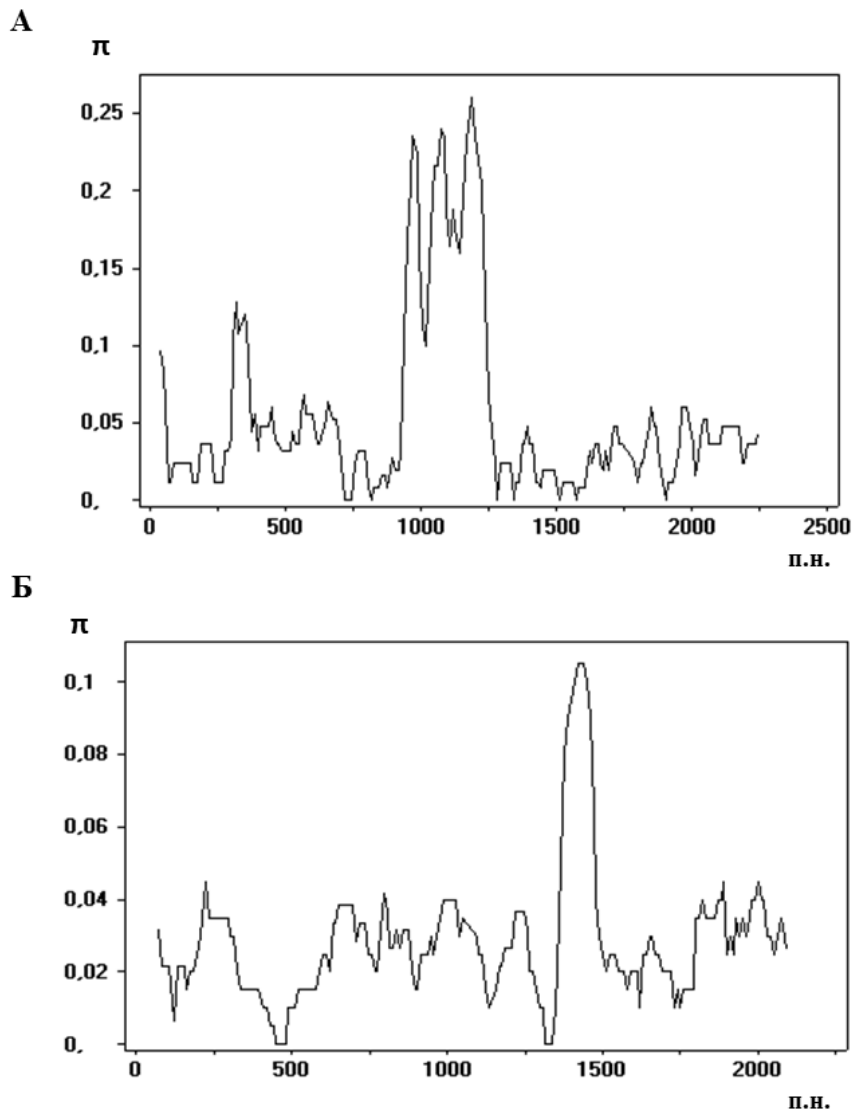


Рис. 17. Нуклеотидное разнообразие локусов *FRI.a* (А) и *FRI.b* (Б) (Sliding-window анализ, длина окна: 100, шаг: 25 п.н.). π – нуклеотидное разнообразие (Nei and Li, 1979).

аллель-специфичных полиморфизмов. Области второго экзона и второго интрона являются наиболее консервативными (98%) (табл. 7). Для первого экзона характерно большое число видоспецифичных мононуклеотидных замен, второй экзон содержит небольшое число таких же замен. В третьем экзоне наблюдаются инделы, специфичные для *FRI.a* из генома и субгеномов А (21 п.н.) и *FRI.a* из генома и субгеномов С (27 п.н.). Для всех этих областей характерно наличие геном-специфичных полиморфизмов, а также небольшое число видоспецифичных однонуклеотидных замен. При сравнении последовательностей *FRI.a* из генома и субгенома А, мы находим, что аллели

различаются однонуклеотидными заменами, а у *FRI.a* генома и субгеномов С, помимо однонуклеотидных замен, различия между аллелями вызваны присутствием индела (21 п.н.) в области первого экзона.

В локусе *FRI.b* наиболее консервативной областью является второй экзон, который содержит несколько геном-специфичных мононуклеотидных замен (99%). Область первого экзона содержит большое число геном-специфичных полиморфизмов. В этой области последовательности *FRI.b* из субгенома А *B. napus* и *B. juncea* отличаются от *FRI.b* из генома А и между собой наличием инделов из 22 и 18 п.н., соответственно. Последовательности аллелей *FRI.b* из генома А различаются наличием инделов в начале первого экзона и начале первого интрона. Область третьего экзона содержит моно и полинуклеотидные геном-специфичные замены и одну делецию длиной 3 п.н., которая специфична для *FRI.b* из генома и субгенома А.

Таким образом, у последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* из геномов и субгеномов А и С самыми вариабельными являются N- и С-концевая области гена (первый и третий экзоны) (табл. 7).

Для локусов *FRI.a* и *FRI.b* геномов и субгеномов А и С *Brassica* мы провели сравнительный анализ полиморфизмов в экзонах и интронах. Оказалось, что область первого экзона содержит наибольшее число несинонимичных замен (рис. 18). Сравнительный анализ последовательностей фрагментов гена *FRI.a* генома и субгеномов В показал, что область первого интрона несет множество локус- и геном-специфичных, мононуклеотидных и полинуклеотидных замен. Область второго экзона наиболее консервативна и содержит лишь несколько однонуклеотидных замен, отличающих *FRIGIDA* из генома и субгеномов *Brassica* В от ортологов из геномов А и С. Второй интрон в этом фрагменте гена отличается от соответствующих участков *FRIGIDA* геномов А и С однонуклеотидными заменами и делециями. Третий экзон содержит множество инсерций и делеций и имеет наибольшее сходство с *R. sativus*.

Таблица 7. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей экзонов и интронов локусов *FRIGIDA* геномов и субгеномов А и С *Brassica*.

Сравниваемые последовательности <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> геномов и субгеномов А и С <i>Brassica</i>		Локус <i>FRI.a</i>					Локус <i>FRI.b</i>				
		Экзон 1	Экзон 2	Экзон 3	Интрон 1	Интрон 2	Экзон 1	Экзон 2	Экзон 3	Интрон 1	Интрон 2
<i>BraA.FRI</i>	<i>BolC.FRI</i>	94	97	92	67	97	95	98	94	94	86
<i>BraA.FRI</i>	<i>BjuA.FRI</i>	99	100	99	100	100	99	100	100	100	100
<i>BraA.FRI</i>	<i>BcaC.FRI</i>	94	96	92	66	98	99	100	100	100	100
<i>BraA.FRI</i>	<i>BnaA.FRI</i>	99	99	99	99	100	100	100	100	100	100
<i>BraA.FRI</i>	<i>BnaC.FRI</i>	95	97	92	67	97	95	98	95	95	85
<i>BolC.FRI</i>	<i>BjuA.FRI</i>	95	97	93	67	97	95	98	94	94	86
<i>BolC.FRI</i>	<i>BcaC.FRI</i>	98	99	98	94	99	95	98	94	94	86
<i>BolC.FRI</i>	<i>BnaA.FRI</i>	94	96	93	67	97	96	98	94	94	86
<i>BolC.FRI</i>	<i>BnaC.FRI</i>	100	100	99	100	100	99	99	99	99	99

<i>BjuA.FRI</i>	<i>BcaC.FRI</i>	94	96	93	66	98	100	100	100	100	100
Сравниваемые последовательности <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> геномов и субгеномов А и С <i>Brassica</i>		Локус <i>FRI.a</i>					Локус <i>FRI.b</i>				
		Экзон 1	Экзон 2	Экзон 3	Интрон 1	Интрон 2	Экзон 1	Экзон 2	Экзон 3	Интрон 1	Интрон 2
<i>BjuA.FRI</i>	<i>BnaA.FRI</i>	99	99	100	99	100	97	100	100	100	100
<i>BjuA.FRI</i>	<i>BnaC.FRI</i>	95	97	93	67	97	95	98	95	95	85
<i>BcaC.FRI</i>	<i>BnaA.FRI</i>	93	95	93	66	98	97	100	100	100	100
<i>BcaC.FRI</i>	<i>BnaC.FRI</i>	98	99	98	94	99	95	98	95	95	85
<i>BnaA.FRI</i>	<i>BnaC.FRI</i>	95	96	93	67	97	96	98	95	95	85
Среднее значение		96	98	95	79	98	97	99	97	97	92

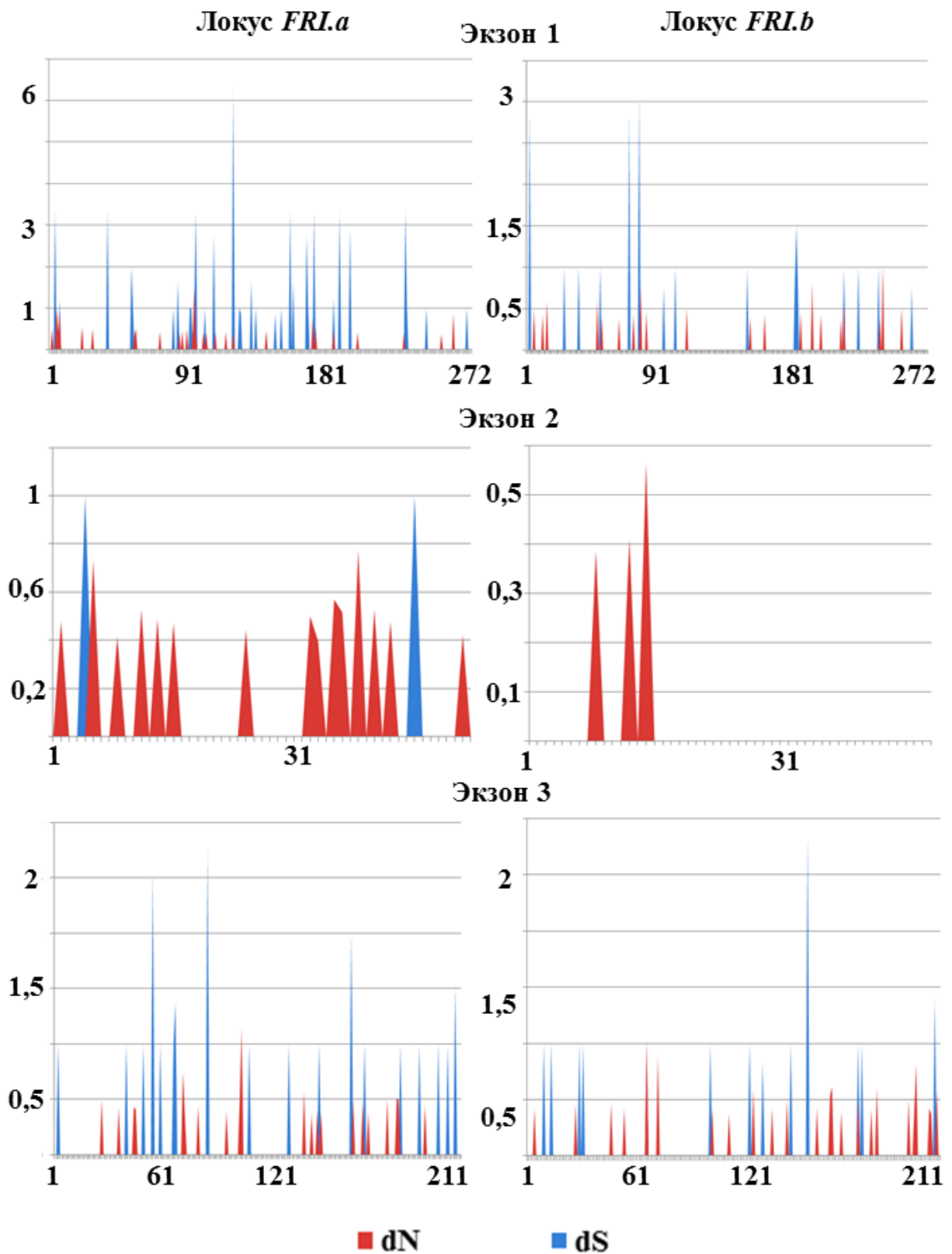


Рис. 18 Полиморфизм экзонов в локусах *FRI.a* и *FRI.b* у диплоидных и тетраплоидных видов *Brassica*. Синонимичные (dS) и несинонимичные (dN) замены в локусах *FRI.a* и *FRI.b*. На оси абсцисс показаны позиции кодонов, на оси ординат – значения dS и dN.

Последовательности фрагментов гена *FRI.b* в геноме и субгеномах В *Brassica* так же сильно отличаются от последовательностей их ортологов из геномов А и С. Фрагмент первого экзона содержит полиморфизмы, характерные только для генома и субгеномов В. Первый интрон отличается наличием делеций и мононуклеотидных замен. Для второго экзона характерно небольшое число геном-специфичных мононуклеотидных замен. В третьем экзоне находится большое число геном-специфичных моно и полинуклеотидных замен. Оба интрона отличаются от *FRI.b* из геномов и субгеномов А и С наличием инсерций/делеций и моно- и полинуклеотидными заменами.

3.6. Анализ последовательностей белков FRIGIDA.a и FRIGIDA.b у видов *Brassica*

Производные аминокислотные последовательности FRIGIDA.a и FRIGIDA.b, характерные для геномов и субгеномов А и С *Brassica*, оказались немного короче (555-596 а.о.), чем у прототипа из *A. thaliana* (609 а.о.). Все полученные последовательности FRIGIDA из геномов и субгеномов А и С содержат консервативный участок, который соответствует центральному домену Frigida (286-308 а.о.), характерному для суперсемейства белков FRIGIDA и FRIGIDA-LIKE 1 (Risk et al., 2010), и С- и N- концевые области, важные для функциональной активности белка (табл. 8, рис. 19). Присутствие специфичной 37-аминокислотной последовательности в N-концевой части белков FRIGIDA.a и FRIGIDA.b *Brassica* позволяет отнести эти белки к классу I FRIGIDA, а не к FRIGIDA-LIKE. Размер белковых продуктов предполагаемых транскриптов фрагментов *FRI.a* и *FRI.b* из генома и субгеномов В составляет 344 а.о. и 339 а.о. Эти аминокислотные последовательности также включают консервативный домен Frigida и большую часть С-концевого региона. Сходство с соответствующими участками белка FRIGIDA из геномов и субгеномов А и С составляет 82-88% (табл. 9).

Таблица 8. Структура аминокислотных последовательностей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b *Brassica*.

Белок FRIGIDA.a и FRIGIDA.b	coiled-coil домен					Аминокислотные повторы			Консервативный домен Frigida		
	1-й домен			2-й домен			Кол-во	Повтор	Позиция	Длина*	Позиция
	Длина, а.о.	Позиция	Вероятность образования, %	Длина, а.о.	Позиция	Вероятность образования, %					
<i>BraA. FRIGIDA.a</i> Chifu	38	58	< 5	31	393	100	3	MEEARSIS	472	301	116-416
<i>BraA. FRIGIDA.a</i> PakChoi		58	< 5		394	100	3		473	302	116-417
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> A12 DH		57	76		393	100	2		463	298	119-416
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> Frosty		50	76		383	100	2		453	298	109-406
<i>BraA. FRIGIDA.b</i> Chifu		52	< 5	32	392	98	1	MEGEARSIS	454	300	116-415
<i>BraA. FRIGIDA.b</i> PakChoi		45	< 5		371	96	1		433	286	109-394
<i>BolC. FRIGIDA.b</i> Frosty		52	< 5	32	400	100	1	MEQGARSIS	462	308	116-423
<i>A. thaliana</i>		60	98		409	97	1	MEEKARSLS	471	308	125-432

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей FRIGIDA из геномов и субгеномов В с FRIGIDA-LIKE 1 и FRIGIDA-LIKE 2 *A. thaliana* выявило всего 14-17% сходства. Эти результаты позволяют отнести белки FRIGIDA из генома и субгеномов В к классу I FRIGIDA, а не к FRIGIDA-LIKE. У всех полученных нами последовательностей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b геномов и субгеномов А и С *Brassica*, образование coiled-coil домена на С-концевом участке белка предсказано с высокой вероятностью (0.9–1.0). В N-концевой области coiled-coil домен определен только в последовательностях FRIGIDA.a из *B. oleracea* (геном С) и *B. carinata* (субгеном С), а также у *B. juncea* (субгеном А) (табл. 8, рис. 19). У последовательностей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b генома и субгеномов В образование coiled-coil домена на С-концевом участке белка предсказано с вероятностью 1,0 и 0,95, соответственно (рис. 19).

Для полученных аминокислотных последовательностей характерны аминокислотные повторы MEEARSIS в С-концевой области белка FRIGIDA У FRIGIDA.a из генома и субгеномов А содержится три повтора MEEARSIS, из генома и субгеномов С - два таких же повтора, для генома В характерен один повтор MEEEEARAIIS. У FRIGIDA.b из генома и субгеномов А и В по одному повтору MEGEARSIS, для генома и субгеномов С характерен один повтор MEQGEARSIS. Эти повторы перекрываются с доменом Frigida и coiled-coil доменом в С-концевом участке белка (табл. 7).

Мы сравнили полученные нами последовательности последовательности FRIGIDA.a и FRIGIDA.b геномов и субгеномов А и С *Brassica* с известными последовательностями FRIGIDA из тетраплоида *B. napus* (АС геном). Оказалось, что аминокислотные последовательности FRIGIDA из диплоидных форм совпадали с последовательностями из тетраплоидных форм на 95-99% (табл. 9).

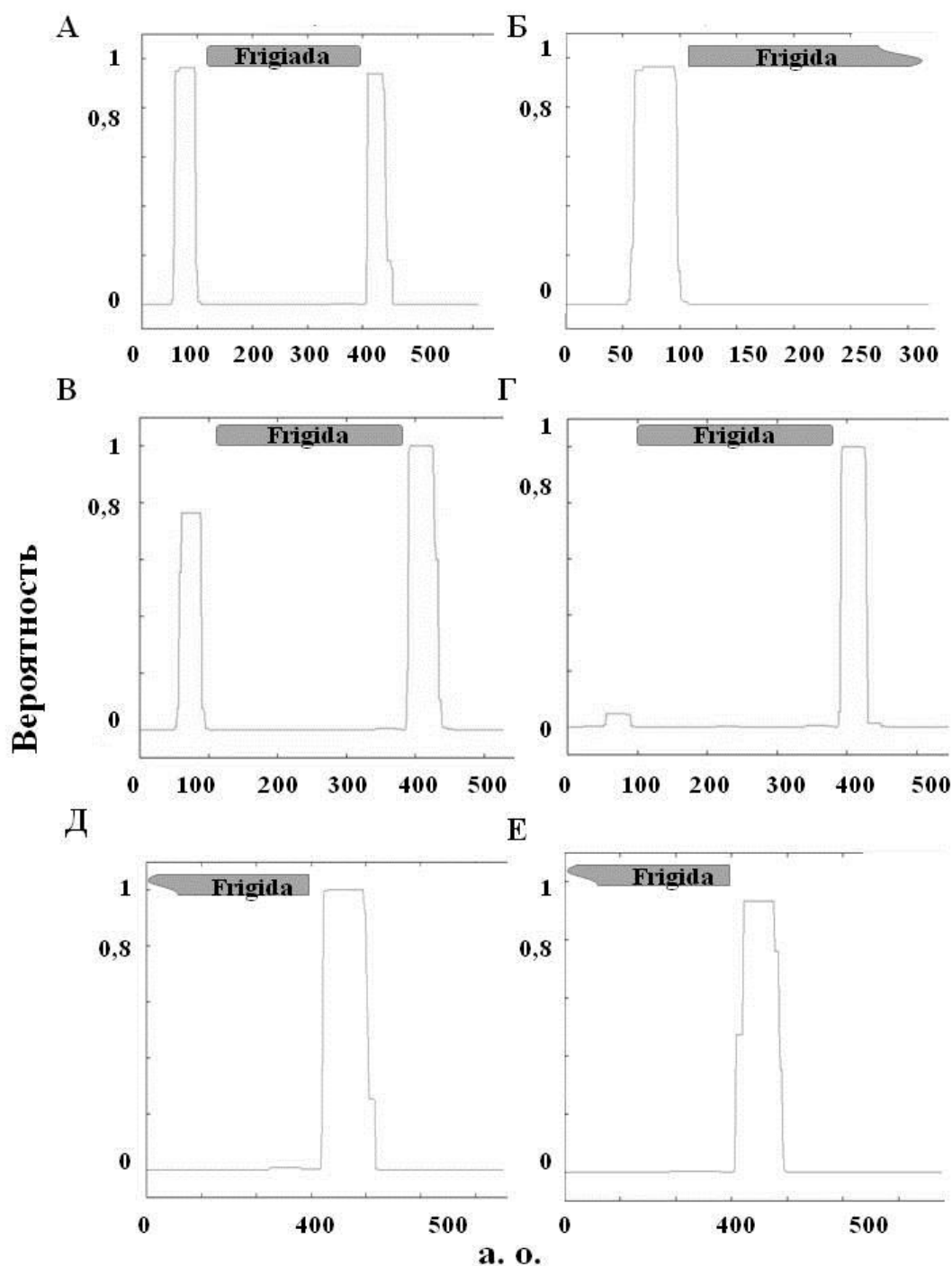


Рис. 19. Предсказание coiled-coil доменов в белках FRIGIDA у растений *Arabidopsis* и *Brassica*. (А) Функциональный белок FRIGIDA у *A. thaliana* (AAG23414), (Б) Нефункциональный белок FRIGIDA у *A. thaliana* (NC_003075), (В) FRIGIDA.a из *B. oleracea* (AFC90010, AFC68978) и (Г) белки FRIGIDA.a из *B. rapa* (AEJ81950, AFC68976), *B. carinata* (AHJ09876) и *B. juncea* (AHM25020), и FRIGIDA.b у *B. rapa* (AEJ81951, AFC68977) и *B. oleracea* (AFC68979), (Д) фрагмент белка FRIGIDA.a у *B. nigra* (AHJ09878), (Е) фрагмент белка FRIGIDA.b у *B. nigra* (KJ649744).

Таблица 9. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей FRIGIDA у видов *Brassica*

Белки FRIGIDA.a и FRIGIDA.b в диплоидных видах <i>Brassica</i>	Белок FRIGIDA.a						Белок FRIGIDA.b					
	субгеном А		субгеном С		Субгеном В		субгеном А		субгеном С		Субгеном В	
	<i>BnaA.FRI.a</i> (AFA43304)	<i>BjuA.FRI.a</i> (AHM25020)	<i>BnaC.FRI.a</i> (AFA43307)	<i>BcaC.FRI.a</i> (AHJ09876)	<i>BjuB.FRI.a*</i>	<i>BcaB.FRI.a*</i>	<i>BnaA.FRI.b</i> (AFA43305)	<i>BjuA.FRI.b</i> (AHW45708)	<i>BnaC.FRI.b</i> (AFA43306)	<i>BcaC.FRI.b</i> (AHW45707)	<i>BjuB.FRI.b</i> (KJ649746)	<i>BcaB.FRI.b</i> (AHW45709)
<i>BraA. FRIGIDA.a</i> Chifu (AEJ81950)	98	99	90	87	76	77	70	70	68	67	81	82
<i>BraA. FRIGIDA.a</i> PakChoi (AFC68976)	98	98	90	87	76	77	70	70	68	67	83	82
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> A12DH (AFB73908)	89	88	97	99	78	79	68	68	70	69	84	83
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> A12DH (AFC90010)	89	88	97	99	78	79	68	68	70	69	84	83
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> Frosty (AFC68978)	90	85	99	95	77	77	68	68	69	67	82	82
<i>BolC. FRIGIDA.a</i> E8	90	86	99	96	77	77	69	69	69	67	82	82

(AFB73850)												
<i>BolC.</i> FRIGIDA.a E1 (AFB73851)	89	88	97	99	78	79	68	68	70	69	84	83
<i>BraA.</i> FRIGIDA.b Chifu (AEJ81951)	69	62	68	67	76	77	99	99	92	92	89	86
<i>BraA.</i> FRIGIDA.b PakChoi (AFC68977)	69	55	69	60	76	77	99	99	91	91	88	89
<i>BolC.</i> FRIGIDA.b Frosty (AFC68979)	68	63	67	68	73	74	91	90	98	98	91	91
<i>BolC.</i> FRIGIDA.b A12DH (AFB73907)	68	63	68	68	74	74	92	91	100	99	91	91
<i>BniB.</i> FRIGIDA.a (AHJ09878)	76	77	78	79	98	99	78	76	74	73	78	77
<i>BniB.</i> FRIGIDA.b (KJ649744)	75	76	74	76	76	77	88	88	88	88	97	99

- Регистрация этих последовательностей не завершена.

3.7. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* *Brassica*

Сопоставление всех исследованных последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* из геномов А, В и С. (рис. 20) наглядно иллюстрирует наши представления о двух локусах *FRIGIDA* в линиях *Brassica* А/С и В и аллельном полиморфизме этих локусов, связанном с особенностями геномов *Brassica*.

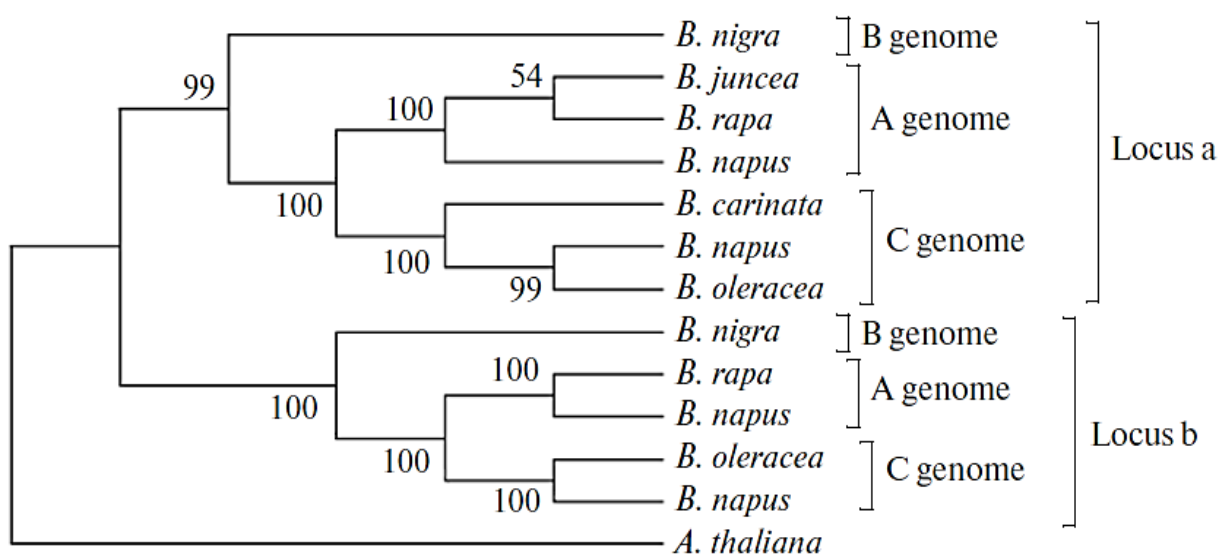


Рис. 20. Дендрограмма гомологов *FRIGIDA* в геномах *Brassica* А, В и С. Алгоритм Maximum Likelihood; bootstrap рассчитан для 1000 повторов. Дерево укоренено относительно нуклеотидной последовательности *FRIGIDA* из *A. thaliana* H51 (AF228499).

3.8. Локусы *FRIGIDA* у фенотипически контрастных форм *Brassica*

Для N-концевого региона *FRI.a* из субгенома А *B. napus* известны шесть SNP, ассоциированных со временем перехода к цветению (Wang et al., 2011). Мы провели сравнительный анализ этого участка *FRI.a* у контрастных по времени перехода к цветению форм *B. rapa*: «упрямцев», не зацветающих на второй год, и двулетников, зацветающих уже в первый год развития. Для клонирования области N-региона *FRI.a* и *FRI.b* мы использовали пары праймеров BrAC.FRIaF и BrA.FRIaFR, BrA.FRIbF и BrAC.FRIbR. Фрагменты локусов *FRI.a* и *FRI.b* были клонированы из «упрямцев» *B. rapa* turnip VIR к-

155, k -158, k -163 и двулетних, но преждевременно зацветающих *B. napus* k-507 Bonsei Osaka Shinora. Аминокислотные последовательности этих клонов сравнили с *FRI.a* *B. napus* cv. Express (поздноцветущий тип), *B. napus* cv. Ningyou7 (раннецветущий тип) и ранее клонированных нами локусов *FRI.a* и *FRI.b* *B. rapa*.

```

BraA.FRIGIDA.a (163) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD
BraA.FRIGIDA.a (155) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD
BnaA.FRIGIDA.a (Nin) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD
BraA.FRIGIDA.a (Chi) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD
BnaA.FRIGIDA.a (Exp) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD
BnaA.FRIGIDA.a (507) MAVRNGSLLPAPSTREEEQPSSAMIQRREAQATVETVPTNIETTIEQSNDFQFLKSIVD

BraA.FRIGIDA.a (163) LTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAI
BraA.FRIGIDA.a (155) LTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAI
BnaA.FRIGIDA.a (Nin) LTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAI
BraA.FRIGIDA.a (Chi) LTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAI
BnaA.FRIGIDA.a (Exp) LTALAAAVDVFKRRYDELQSHMDYIENAIIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAV
BnaA.FRIGIDA.a (507) LTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSNLKTNGI IETAAASPPFQNKTTATAI

BraA.FRIGIDA.a (163) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF
BraA.FRIGIDA.a (155) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF
BnaA.FRIGIDA.a (Nin) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF
BraA.FRIGIDA.a (Chi) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF
BnaA.FRIGIDA.a (Exp) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF
BnaA.FRIGIDA.a (507) ACQSPPEKXSEAERFCESMWSKELRRYMFVNI SERAKLIEEIPGALKLAKDPAKF

BraA.FRIGIDA.a (163) VLDCIGKFYLQGRKAFADLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGE-KKKK
BraA.FRIGIDA.a (155) VLDCIGKFYLQGRKAFANDLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGEKCKK
BraA.FRIGIDA.a (Chi) VLDCIGKFYLQGRKAFADLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGE-KKKK
BnaA.FRIGIDA.a (Nin) VLDCIGKFYLQGRKAFADLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGE-KKKK
BnaA.FRIGIDA.a (Exp) VLDCIGKFYLQGRKAFADLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGE-KKKK
BnaA.FRIGIDA.a (507) VLDCIGKFYLQGRKAFADLPAITARKVSLILECYLLTFDPEGE-KKKK

```

Рис. 21. Множественное выравнивание N-концевой области белков FRIGIDA.a из фенотипически контрастных форм *Brassica*. Горизонтальной линией обозначена область coiled-coil домена. 163 и 155 - *B. rapa* turnip VIR k-155 и k -163; 507 - *B. rapa* k-507 Bonsei Osaka Shinora; Chi – *B. rapa* Chifu; Exp – *B. napus* cv. Express; Nin - ; *B. napus* cv. Ningyou7. Красным выделены аминокислотные остатки, характерные для раннецветущего типа, синим – для поздноцветущего типа.

Фрагмент белка FRIGIDA.a из растений *B. rapa* turnip k-155 идентичен FRIGIDA.a *B. rapa* cv. PakChoi (AFC68976), а участки FRIGIDA.a *B. rapa* turnip k -158, k -163 и *B. rapa* k-507 Bonsei Osaka Shinora соответствуют последовательностям FRIGIDA.a *B. rapa* cv. Chifu (AEJ81950) и *B. napus* cv. Express (AFA43304). Фрагмент белка FRIGIDA.b *B. rapa* turnip k-155 на 100%

соответствует белку FRIGIDA.b в растениях *B. napus* cv. Express (AFA43305) и *B. rapa* cv. PakChoi (AFJ12106). Фрагмент белка FRIGIDA.b *B. rapa* turnip k-163 отличается от всех других последовательностей двумя одиночными заменами и наличием делеции длиной в 11 а.о. Аминокислотные замены, характерные для FRIGIDA.a раннецветущего типа *B. napus* cv. Ningyou7, обнаружены у двулетних, но преждевременно зацветающих растений образца *B. rapa* k-507 Wonseï Osaka Shinoga. Однако такие же замены найдены и у растений *B. rapa*, которые должны зацвести в первый год, но не зацвели (рис. 21). Поэтому мы не можем связать эти полиморфизмы со временем зацветания исследованных образцов *Brassica*.

3.9. SCAR маркеры, сконструированные на основе полиморфизмов гена *FRIGIDA*

Обнаруженные нами в геномах *Brassica* последовательности *FRIGIDA* были использованы для создания специфичных ДНК маркеров. На основе полиморфных локусов гена *FRIGIDA* была создана система SCAR маркеров для изучения структуры и аллельного разнообразия локусов *FRI.a* и *FRI.b* геномов и субгеномов А, С и В культурных видов *Brassica* и удобная для проведения массового скрининга система локус-специфичных маркеров для определения локусов *FRI.a* и *FRI.b* в геномах и субгеномах А, С и В *Brassica*.

Для верификации созданных SCAR маркеров был проведен скрининг 27 образцов геномной ДНК *B. rapa* (геном А), 12 образцов *B. oleracea* (геном С), четырех образцов *B. carinata* (геном ВС), четырех образцов *B. juncea* (геном АВ) и двух образцов *B. napus* (геном АС). Все исследованные образцы *Brassica* одновременно содержали оба локуса *FRI.a* и *FRI.b*. Для проверки специфичности маркеров BrA.FRIa, BrA.FRIb и BrC.FRIa, BrC.FRIb по отношению к геномам А и С в качестве отрицательного контроля использовали геномную ДНК *B. nigra* (геном В).

На основании полиморфизмов, характерных для *FRI.a* и *FRI.b* из *B. nigra* были сконструированы геном-специфичные праймеры BrB.FRIaF и

Табл. 10. Маркеры локусов гена *FRIGIDA* из геномов А, В и С *Brassica*

Локус- и геном-специфичные SCAR маркеры для изучения аллельного разнообразия локусов <i>FRIGIDA</i> геномов субгеномов А и С <i>Brassica</i>				
Наименование маркера	Наименование праймеров*	Специфичность		Размер ампликона, п.н.
		Локус	Геном	
<i>BrA.FRI.a</i>	BrAC.FRIaF BrA.FRIaR	<i>FRI.a</i>	А	~2500
<i>BrC.FRI.a</i>	BrAC.FRIaF BrC.FRIaR	<i>FRI.a</i>	С	~2500
<i>BrA.FRI.b</i>	BrA.FRIbF BrAC.FRIbR	<i>FRI.b</i>	А	~2100
<i>BrC.FRI.b</i>	BrC.FRIbF BrAC.FRIbR	<i>FRI.b</i>	С	~2100
Ген-специфичные SCAR маркеры для изучения аллельного разнообразия локусов <i>FRIGIDA Brassica</i>				
Наименование маркера	Наименование праймеров*	Специфичность		Размер ампликона, п.н.
		Локус	Геном	
<i>Br.FRI.a</i> <i>Br.FRI.b</i>	BrFRIF BrFRIR	нет	нет	~1300
Локус- и геном-специфичные маркеры для массового скрининга локусов <i>FRI.a</i> и <i>FRI.b</i> геномов А, В и С <i>Brassica</i>				
Наименование маркера	Наименование праймеров*	Специфичность		Размер ампликона, п.н.
		Локус	Геном	
<i>BrA.FRI.a</i>	BrAC.FRIaF BrAC.FRIaFRIbR	<i>FRI.a</i>	А и С	~720
<i>BrB.FRI.a</i>	BrB.FRIaF BrB.FRIaR	<i>FRI.a</i>	В	~940
<i>BrC.FRI.a</i>	BrAC.FRIaF BrAC.FRIaFRIbR	<i>FRI.a</i>	А и С	~720
<i>BrA.FRI.b</i>	BrA.FRIbF BrAC.FRIaFRIbR	<i>FRI.b</i>	А	~720
<i>BrB.FRI.b</i>	BrB.FRIbF BrB.FRIbR	<i>FRI.b</i>	В	~500
<i>BrC.FRI.b</i>	BrC.FRIbF BrAC.FRIaFRIbR	<i>FRI.b</i>	С	~720

Примечание: WW соответствует AT/AA, *Последовательности праймеров указаны в табл. 3

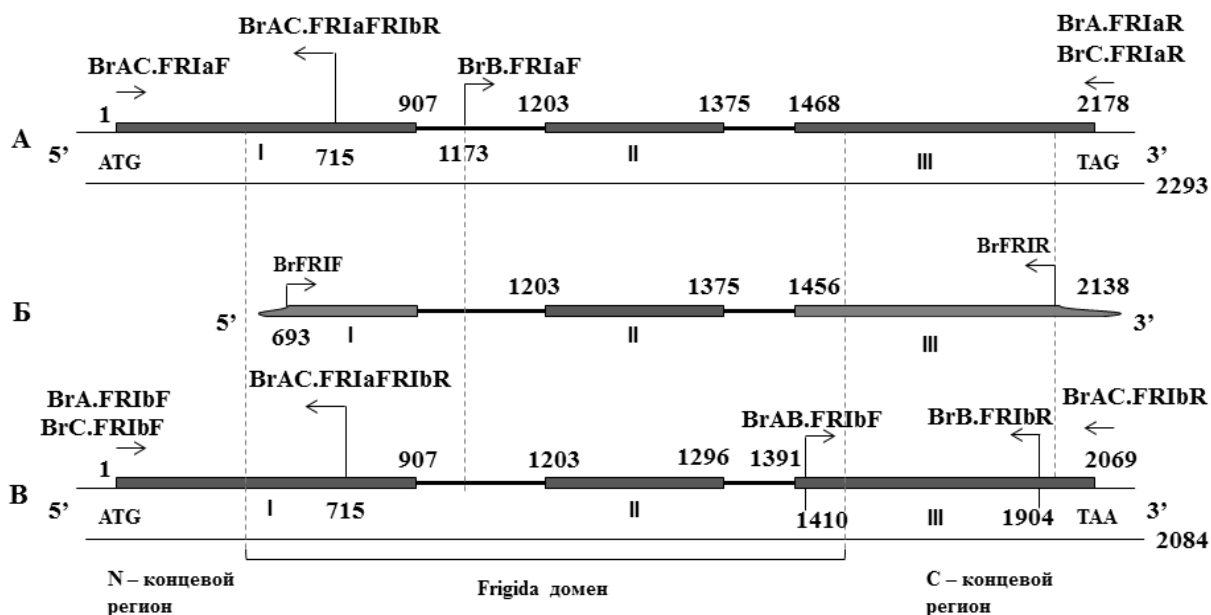


Рис. 22. Маркеры, различающие локусы *FRIGIDA* в геномах *Brassica* A, B и C. А – локус *FRI.a* в геномах А и С, Б – фрагмент гена *FRIGIDA* из генома В, В – локус *FRI.b* из геномов А и С. 1 – положение старт-кодона, 2178 и 2069 – положение стоп-кодонов. Интроны обозначены сплошной черной линией. Черными прямоугольниками и римскими цифрами обозначены экзоны. Арабскими цифрами и стрелками показано расположение и направление праймеров. Горизонтальной скобкой обозначено положение центрального консервативного домена *Frigida*. Шкала соответствует гену *FRIGIDA* JN015481.

BrB.FRIaR для амплификации фрагмента *FRI.a* (около 940 п.н.) и BrB.FRIbF и BrB.FRIbR для амплификации фрагмента *FRI.b* (около 500 п.н.) из генома В *B. nigra* и субгенома В из *B. juncea* и *B. carinata* (рис. 22, табл. 10). Для верификации этих праймеров был проведен скрининг образцов геномной ДНК *B. nigra* (геном В), *B. carinata* (геном ВС), *B. juncea* (геном АВ). При верификации маркеров, специфичных по отношению к геному В, в качестве отрицательного контроля были взяты образцы геномной ДНК *B. rapa* (геном А) и *B. oleracea* (геном С) (рис. 23). Присутствие двух локусов *FRI.a* и *FRI.b* выявлено и в этих образцах *Brassica*. Для проверки маркеров, специфичных по отношению к геномам А и С, в качестве отрицательного контроля была взята геномная ДНК *B. nigra* (геном В).

Для быстрого скрининга локусов *FRI.a* и *FRI.b* у культурных видов *Brassica* мы создали систему локус-специфичных маркеров, дающих

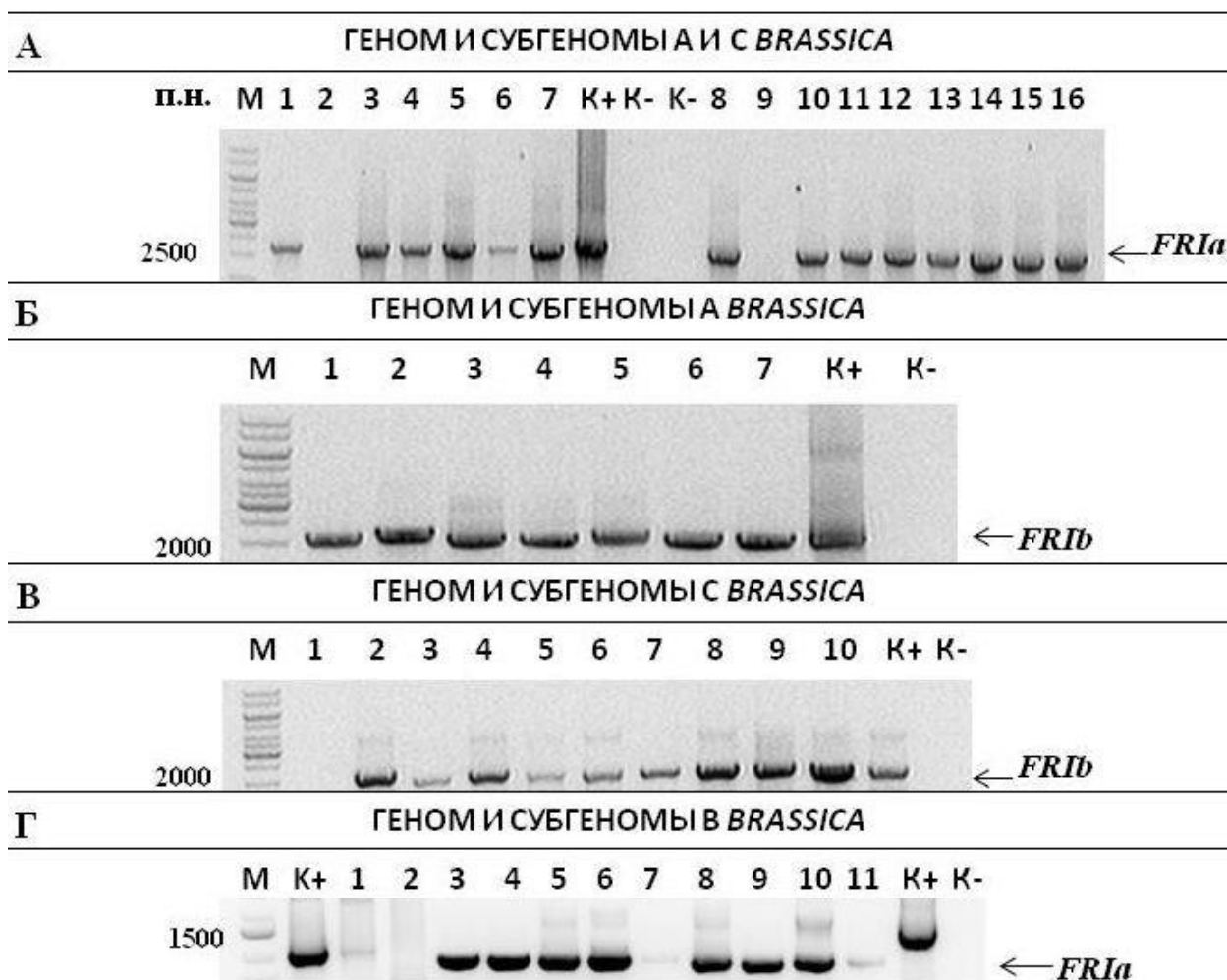


Рис. 23. Локус-специфичные SCAR маркеры геномов А, В и С для изучения аллельного разнообразия гена *FRI.a* и *FRI.b* *Brassica*. (А) Локус-специфичные маркеры гена *FRI.a* геномов А и С. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, 1, 3-5, 7 - *B. rapa*, 8, 10, 12 – 16 - *B. oleracea*, 6, 11 - *B. napus*. 2,9 - *B. nigra*, К+ - плазмидная ДНК pJET/*FRIb* Frosty, К- - вода. (Б) Локус-специфичный маркер гена *FRI.b* генома А. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, 1-4 - *B. rapa*, 5-6 – *B. juncea*, 7 – *B. napus*, К+ - плазмидная ДНК pJET/*FRIb* *B. oleracea*, К- - вода. (В) Локус-специфичный маркер гена *FRI.b* генома С. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, 1- *B. nigra*, 2, 4, 6 - 9 – *B. oleracea*, 3, 10 – *B. juncea*, 5 – *B. napus*, К+ - плазмидная ДНК pJET/*FRIb* *B. oleracea*, К- - вода. (Г) Локус-специфичный маркер гена *FRI.a* генома В. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, 1, 2 - плазмидная ДНК pTZ57/*FRIb* *B. nigra*, 3, 4, 5, 6- *B. nigra*, 7, 8 - *B. carinata* CGN03952, 9, 10 - *B. juncea*, 11 - *B. oleracea*, К+ - положительный контроль - плазмидная ДНК pTZ57/*FRIa* *B. nigra*, К- - вода.

единичный сигнал амплификации. В геномах А и С в области первого интрона найден участок, общий для обоих локусов *FRI.a* и *FRI.b*. На

основании этого участка был создан ген-специфичный праймер BrAC.FRIaFRIb (рис. 22, таб. 10).

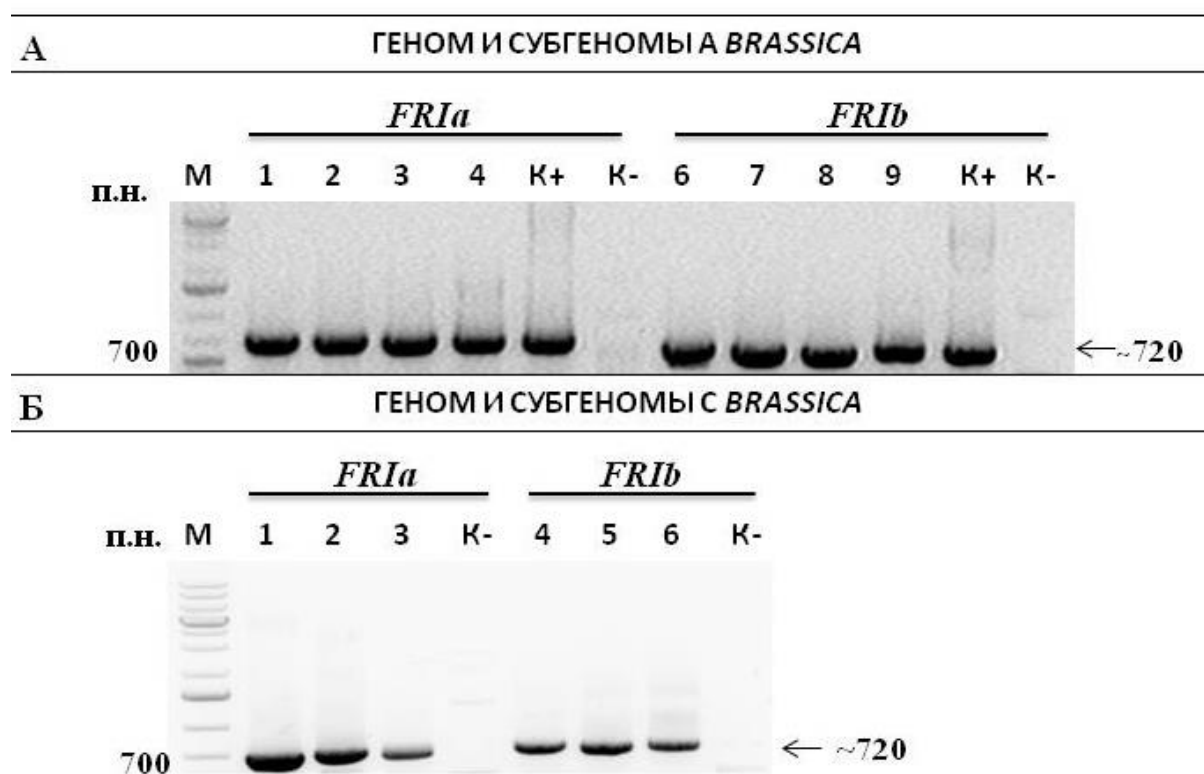


Рис. 24. Локус-специфичные маркеры гена *FRI.a* и *FRI.b* геномов А и С. (А) Локус-специфичные маркеры генов *FRI.a* и *FRI.b* генома А. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, Локус *FRI.a* (1-4): 1- *B. rapa*, 2 – *B. napus*, 3 – *B. juncea*, 4 - *B. oleracea* К+ - плазмидная ДНК рTZ57R/*FRI.a* *B. rapa*, К- - плазмидная ДНК рJET/*FRI.b* *B. rapa*; Локус *FRI.b* (6-9): 6-7 - *B. rapa*, 8 – *B. napus*, 9 – *B. juncea*, К+ - плазмидная ДНК рJET/*FRI.b* *B. rapa*, К- - рTZ57R/*FRI.a* *B. rapa*. (Б) Локус-специфичные маркеры генов *FRI.a* и *FRI.b* генома С. М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, Локус *FRI.a* (1-3) 1 – *B. oleracea*, 2 – *B. carinata*, 3 – *B. napus*, Локус *FRI.b* (4-6): 4 - *B. oleracea*, 5 – *B. carinata*, 6 – *B. napus*, К- - вода.

Для верификации созданных маркеров был проведен скрининг 54 образцов геномной ДНК из растений *B. rapa* (геном А), *B. oleracea* (геном С), *B. carinata* (геном ВС), *B. juncea* (геном АВ), *B. nigra* и *B. napus* (геном АС). Для амплификации локуса *FRI.a* из генома и субгеномов С *Brassica* и генома и субгенома А *Brassica* использовали пару праймеров BrAC.FRIaF и BrAC.FRIaFRIbR. Для амплификации локуса *FRI.b* из генома и субгенома А

Brassica использовали пару праймеров BrA.FRIbF и BrAC.FRIaFRIbR. Для амплификации локуса *FRI.b* из генома и субгенома С *Brassica* пару праймеров BrC.FRIbF и BrAC.FRIaFRIbR. Размер этих локус-специфичных маркеров составляет около 720 п.н. Для амплификации локуса *FRI.a* из генома и субгеномов В *Brassica* использовали пару праймеров BrB.FRIaF и BrB.FRIaR, (размер ампликона около 940 п.н.), для амплификации локуса *FRI.b* - BrB.FRIbF и BrB.FRIbR (табл. 10). Наличие специфичного локуса в исследуемом образце определяется по появлению сигнала амплификации.

В этом случае для проверки специфичности праймеров по отношению к локусам *FRI.a* и *FRI.b* в качестве отрицательного контроля использовали плазмидную ДНК pJET/*FRIb* *B. rapa* (К- для локуса *FRI.a*) и pTZ57R/*FRIa* *B. rapa* (К- для локуса *FRI.b*). Присутствие сигналов амплификации целевых фрагментов выявлено во всех исследованных образцах *Brassica* (рис. 24). Пара праймеров BrAC.FRIaF и BrAC.FRIaFRIbR является специфичной для локуса *FRI.a* из геномов и субгеномов А и С *Brassica*, но не является геном-специфичной.

Мы надеемся, что в дальнейшем эти маркеры будет удобно использовать и для исследования недостаточно изученной связи гена *FRIGIDA* с локусом признака время перехода к цветению.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Полиморфизм гена *FRIGIDA* в семействе *Brassicaceae*

Анализ нуклеотидного полиморфизма генов внутри или между видами позволяет определить эволюционные взаимоотношения между анализируемыми видами.

Полученные нами последовательности локусов *FRIGIDA* у растений шести видов *Brassica* сходны с последовательностями *FRIGIDA Arabidopsis* на 58-60%. *FRI.a* имеет большее сходство с геном *FRIGIDA* у *A. thaliana*, а *FRI.b* – с геном *FRIGIDA* *A. lyrata*. При анализе нуклеотидного полиморфизма последовательностей локусов *FRIGIDA Brassica*, как и у *FRIGIDA A. thaliana* и *A. lyrata*, полиморфные сайты были обнаружены во всех областях гена. В последовательностях кодирующих и некодирующих областей полиморфные сайты содержатся в сходных пропорциях. Ни в одной из полученных нами последовательностях мы не обнаружили характерных для *FRIGIDA* у *Arabidopsis* индел-полиморфизмов, которые нарушают или сдвигают рамку считывания. Зато в локусе *FRI.b* из геномов и субгеномов *A Brassica* мы выявили мутацию донорного сайта сплайсинга (мононуклеотидная замена GT \rightarrow GC). Донорный сайт сплайсинга GT является наиболее консервативным сайтом сплайсинга. Тем не менее, некоторая часть донорных сайтов GT замещается на GC. Такие замещения ранее были обнаружены в донорных сайтах альтернативного сплайсинга у нематод, млекопитающих и арабидопсиса. Предполагается, что GC сигналы важны для регуляции альтернативного сплайсинга (Campbell et. al., 2006; Churbanov et. al., 2008; Filichkin et. al., 2010). Поэтому, можно предположить, что эта мутация может приводить к нарушению сплайсинга и образованию укороченных транскриптов гена *FRIGIDA* у *Brassica*. Но экспериментальное подтверждение этому предположению отсутствует. Таким образом, нам не удалось обнаружить каких-либо инсерций и делеций, приводящих к утрате функций гена.

Если не рассматривать эффект делеций и вставок, то наиболее подходящей мерой полиморфизма является нуклеотидное разнообразие (π). Эта мера не зависит от длины фрагментов ДНК и размера выборки и поэтому может использоваться для сравнения изменчивости ДНК в различных генах и популяциях. Основным показателем для анализа нуклеотидного разнообразия и определения способа эволюции последовательности считается соотношение несинонимичных и синонимичным замен: K_a/K_s – между видами, π_a/π_s – внутри вида, где K_a и π_a – число несинонимичных замен на несинонимичный сайт, K_s и π_s – число синонимичных замен на синонимичный сайт. Значение соотношения K_a/K_s используется в качестве показателя селективного давления, действующего на ген, который кодирует данный белок. Соотношение K_a/K_s больше единицы указывает на положительную селекцию, способствующую изменениям в последовательности белка. Соотношение K_a/K_s менее единицы указывает на отрицательную селекцию, которая направлена на устранение вредных мутаций с целью сохранения функций белка (Hurst, 2002). Точно так же при анализе внутривидового полиморфизма соотношение $\pi_a/\pi_s > 1$ указывает на действие положительного отбора, а соотношение $\pi_a/\pi_s < 1$ свидетельствует о том, что ген находится под действием отрицательного отбора. Однако сочетание положительного и отрицательного отбора в разных областях гена или в разное время в течение эволюции могут компенсировать друг друга, и среднее значение может быть ниже, равно или выше единицы. Поэтому в каждом конкретном случае необходимо проводить дополнительный анализ нуклеотидного разнообразия синонимичных и несинонимичных замен для разных областей гена.

Кроме того, при анализе структурного полиморфизма последовательностей ДНК обращают внимание на показатели содержания G+C богатых участков и эффективное число кодонов (effective number of codons, ENC). Данные о нуклеотидном разнообразии локусов *FRIGIDA* сведены в таблице 11.

Табл. 11. Параметры кодирующей области (КО) локусов *FRIGIDA Brassica*.

		<i>FRI.a</i>				<i>FRI.b</i>			
		1 экзон	2 экзон	3 экзон	Вся КО	1 экзон	2 экзон	3 экзон	Вся КО
	G+C	0,53	0,42	0,47	0,48	0,50	0,41	0,44	0,46
	ENC	54	41-49	56	56	61	49	53	57
Дивергенция	Ka	0,033	0,094		0,035	0,032	0,047		0,040
	Ks	0,12	0,035		0,11	0,069	0,081		0,07
	Ka/Ks	0,28	0,38		0,38	0,46	0,58		0,56
Полиморфизм	π_a	0,24	0,023		0,023	0,018	0,027		0,023
	π_s	0,09	0,06		0,070	0,042	0,044		0,040
	π_a/π_s	2,6	0,38		0,33	0,43	0,61		0,58

Доля G+C в кодирующей области исследованных нами локусов *FRI.a* и *FRI.b Brassica* составляет 50 и 53% для первого экзона, 42 и 41% для второго экзона и 47 и 44% для третьего экзона. У *FRIGIDA Arabidopsis* этот показатель имеет близкое значение, 45,8% для первого экзона и 43% для второго и третьего экзонов (Le Corre et. al., 2002). Эффективное число кодонов используемых в гене, колеблется от 20, когда только один кодон используется для каждой аминокислоты до 61, когда все синонимичные кодоны используются в равной степени. Для локусов *FRI. a* и *FRI.b Brassica* величина ENC для первого экзона составляет 54 и 61, для второго экзона – 50 и для третьего экзона равна 56 и 53, соответственно. Эти результаты лишь немного отличаются от данных для *FRIGIDA* у *Arabidopsis*, где для первого экзона ENC равно 58, а для второго – 52 (Le Corre et. al., 2002).

Для сопоставления последовательностей *FRI.a* и *FRI.b* геномов и субгеномов *Brassica* мы провели анализ нуклеотидного разнообразия этих

последовательностей. При анализе межвидового полиморфизма локусов *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b Brassica* оказалось, что соотношение несинонимичных и синонимичных замен (Ka/Ks) между видами равно, соответственно, 0,28 и 0,46, что отличается от *FRIGIDA* у *Arabidopsis* (0,36 для *A. thaliana* по данным Le Corre et. al., 2002, и 0,3 для *A. lyrata* по данным Kuitinen et. al., 2008), но остается менее единицы; это указывает на отрицательный отбор, направленный на устранение вредных мутаций с целью сохранения белка *FRIGIDA*. У полученных нами последовательностей *FRIGIDA Brassica* несинонимичные замены присутствуют в основном в области первого экзона, которая перекрывается с областью первого coiled-coil домена белка *FRIGIDA*. Во втором и третьем экзоне несинонимичных замен меньше. Таким образом, как и у *Arabidopsis*, кодирующая область гена *FRIGIDA* состоит из двух по-разному эволюционирующих областей: первая включает первый экзон, а вторая состоит из второго и третьего экзонов. Эти две области сходны по длине, но в отличие от *Arabidopsis*, у *Brassica* только вторая область содержит coiled-coil домен.

При анализе внутривидового полиморфизма локусов *FRIGIDA Brassica* мы обнаруживаем у *FRIGIDA.a* ту же картину, что и у гена из *Arabidopsis*. Для второго и третьего экзонов *FRIGIDA.a* разнообразие синонимичных замен (π_s) значительно выше, чем несинонимичных (π_a), это предполагает, что внутри вида на эту часть гена действует отрицательный отбор (purifying selection). В первом экзоне гена *FRIGIDA.a Brassica* мы отмечаем высокое соотношение несинонимичного и синонимичного разнообразия (π_a/π_s среднее значение около 2,6). Для полноразмерного гена, соотношение π_a/π_s составляет 0,33. В отличие от *FRIGIDA.a*, у *FRIGIDA.b* соотношение несинонимичного и синонимичного разнообразия между первой и второй частями кодирующей области гена различается меньше, 0,43 и 0,61, соответственно.

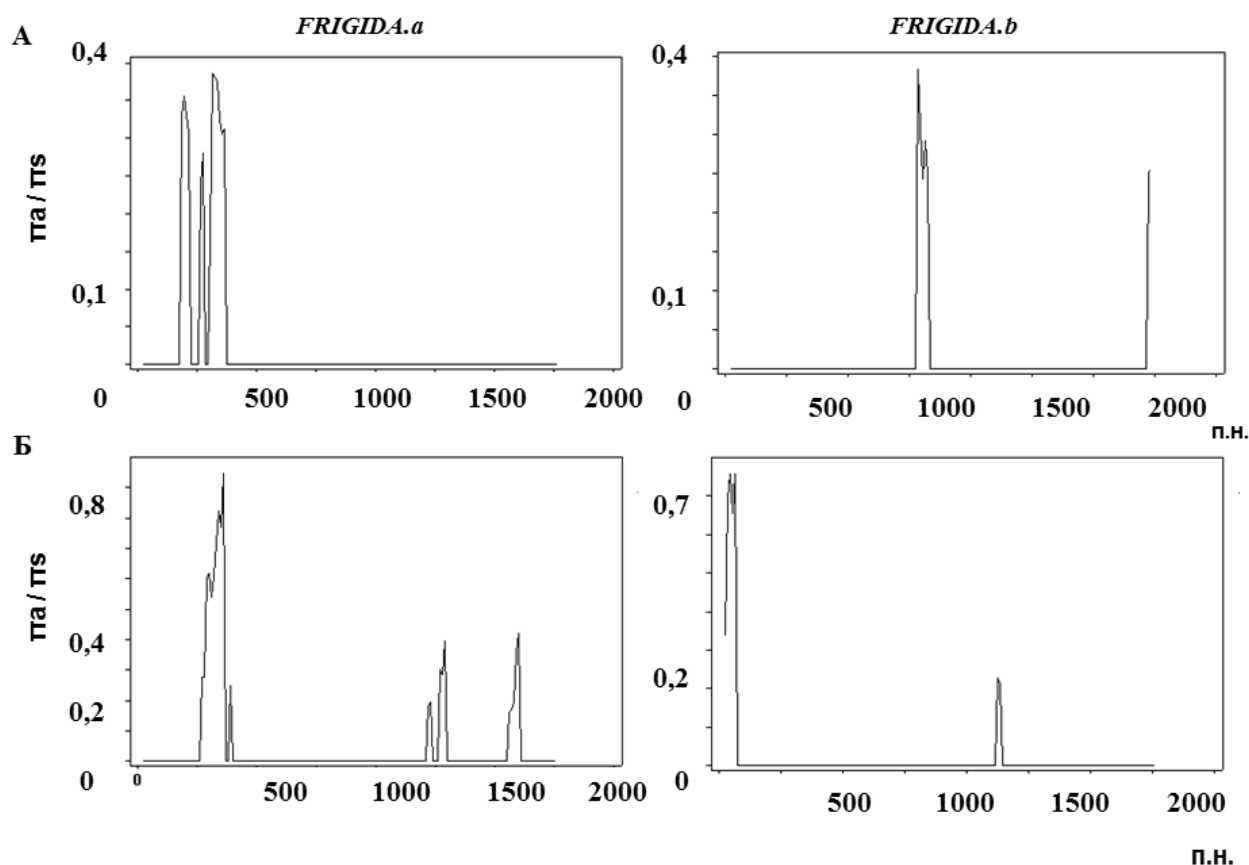


Рис. 25. Внутривидовой полиморфизм кодирующей области локусов *FRIGIDA Brassica*. (А) – геном и субгеномы А, (Б) – геном и субгеномы С. π_a/π_s – соотношение несинонимичных и синонимичных замен, п.н. – пара нуклеотидов.

Учитывая, что несинонимичные сайты являются основной мишенью селективного отбора, анализ распределения несинонимичных замен вдоль кодирующей части гена позволяет сделать вывод о том, что различные участки гена *FRIGIDA* эволюционировали по-разному. Во втором и третьем экзонах *FRIGIDA* несинонимичные замены встречаются реже, чем синонимичные (рис. 25); вероятно, разнообразие в этой части гена в основном обуславливается действием естественного отбора (отрицательной селекции). В первой части кодирующей области *FRIGIDA Brassica*, включающей первый экзон, наблюдается снижение доли синонимичных изменений, связанное с избытком несинонимичных полиморфизмов, в том числе приводящих к заменам аминокислот, которые приводят к изменению физико-химических свойств белка *FRIGIDA*. Это наводит на мысль о том, что избыточные аминокислотные полиморфизмы в основном носят

адаптивный характер и поддерживаются положительной селекцией. Из полученных результатов можно сделать вывод, что первая часть гена *FRIGIDA* в геномах и субгеномах *Brassica* находится под действием положительного отбора, а вторая – под действием отрицательного отбора.

4.2. Структура белка *FRIGIDA* у *Brassica*

По своему строению белки *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b* *Brassica* сходны с *FRIGIDA A. thaliana* (рис. 26). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей этих гомологов показал, что все они содержат консервативный центральный домен *Frigida*, а N- и C-концевые области являются вариабельными.

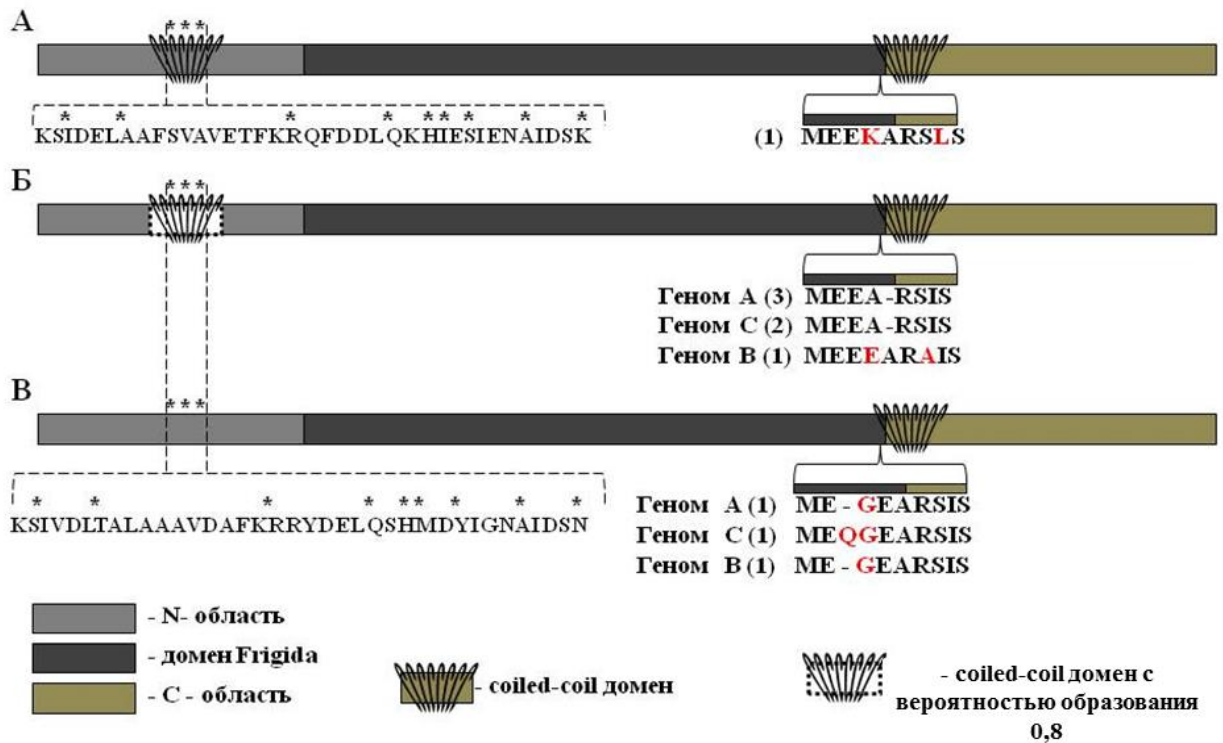


Рис. 26. Структура белка *FRIGIDA*. А - *FRIGIDA* у *A. thaliana*, Б - Белок *FRIGIDA.a* у *Brassica*, В - *FRIGIDA.b* у *Brassica*, MEEKARSLS, MEEARSIS, MEEEARAIS, MEGEARSIS и MEQGEARSIS – аминокислотные повторы (в скобках число повторов), А - С – геномы и субгеномы *Brassica*, (***) - 37-а.о. область, содержащая девять а.о. (*), характерных для класса белков *FRIGIDA*.

Выравнивание этих последовательностей выявило специфические различия в строении белков *FRIGIDA Brassica* и его гомологов из

Brassicaceae (рис. 27), прежде всего, в области восьмиаминокислотных повторов MEEARSIS. У гомологов FRIGIDA Brassicaceae содержится только один такой повтор, последовательность которого отличается от MEEARSIS наличием инсерции и аминокислотных замен. В этой области у *A. thaliana* обнаружена инсерция аминокислоты (K) и аминокислотная замена I →L (MEEKARSLS), у *A. lyrata* – только инсерция аминокислоты K (MEEKARSIS), у *Thellungiella halophila* – инсерция аминокислоты Q (MEEQARSIS). Повторы у FRIGIDA *Brassica* также различаются. Для FRIGIDA.a из генома и субгеномов A характерно наличие трех повторов MEEARSIS, а из генома и субгеномов C – два таких повтора, из генома и субгеномов B – один повтор, содержащий одну инсерцию (E) и замену аминокислоты (S→A). Для FRIGIDA.b характерно присутствие одного повтора, они различаются наличием инсерций. У FRIGIDA.b из геномов и субгеномов A и B в последовательности повтора присутствует инсерция G (MEGEARSIS), а у генома и субгенома C – инсерция из двух аминокислот GQ (MEGEQARSIS). По этим данным можно сделать вывод, что аминокислотные повторы MEEARSIS являются специфичными для определенных видов в случае с FRIGIDA Brassicaceae, а в случае у *Brassica* – являются локус- и геномспецифичными.

В отличие от *A. thaliana*, у белков FRIGIDA *Brassica* только в C-концевой области с высокой вероятностью предсказано образование coiled-coil структуры, которая перекрывается с повтором MEEARSIS и концом домена Frigida. Известно, что C-концевой регион важен для функциональной активности белка FRIGIDA из *A. thaliana*, и coiled-coil домен в этом участке необходим для образования FRI-C комплекса с FLX, SUF4 и FES1 (Choi et al., 2011) и взаимодействия с CBP20 (Geraldo et al., 2009). Учитывая, что только этот домен сохранился в ходе эволюции, можно предположить, что у FRIGIDA *Brassica* он так же необходим для функциональной активности белка, как и у FRIGIDA из *A. thaliana*. N-концевая область у всех

N – область

BrAFRIa	MAVRNGSLLPAPS-TRREEQPSSAMIQ-----RREAQATVETVETNIETTIPQSN	49	BrAFRIa	RFSFSSILTSFLRMKDSFEERAKRQAQAPMASKTANERKLDLALSSVMKCLEAHKLDPAKE	388
BrCFRIa	MAFRNG-YAHRPS-TRREEQPSSAMIR-----RREAQASVETT-----IQQSN	41	BrCFRIa	RFSFSSILTSFLRMSKESFEERAKRQAQAPMASKTANERKLDLALSSVMKCLEAHKLDPAKE	378
BrAFRIb	MAFRNGSLIPADHPS-TRRENOSSPTIQ-----RGTVPTNTEIT-----IQQSN	43	BrAFRIb	RFSAS SILTS FLRMS KESFEERAKRQAQAPIAFKRAKPKFLAALLSSVMKCLEAHNLDPEKE	387
BrCFRIb	MAFRNGSLIPADHPS-TRRENOSSPTIQ-----RGTVPTNTEIT-----IQQSN	43	BrCFRIb	RFSAS SILTS FLRMS KESFEERAKRQAQAPIAFKRAKPKFLAALLSSVMKCLEAHNLDPEKE	395
ThFRI	MIPARGYSHIYFS-TTEKPSPATIIFRLHQDQSERRGDPAINRTEETNKEITSGDSK	59	ThFRI	KISFSSILTPFLRKSSEFEELAKRKAHSPTAFKRAIEKQLAALLSVTKCLEAHKLDPAKE	412
AlpFRI	MANYPTVAAGSSAAIPLLHQHQSERR-----RGE LPAVWETES TAMEI SIGQSK	52	AlpFRI	KFSAS SVLTS FLRMS KESFEERAKRQAQSP LAFKRAAARQLAALLSSVMKCMETHKLDPAKE	407
AllFRI	MANYPTVAAGSSAAIPLLHQHQSERR-----RGE LPAVWETES TAMEI SIGQSK	52	AllFRI	KFSAS SVLTS FLRMS KESFEERAKRQAQSP LAFKRAAARQLAALLSSVMKCMETHKLDPAKE	407
AtFRI	MSNYPTVAAGPTTANFLQCR-HQSECR-----RRELPKIVETES TSMOITIGQSK	51	AtFRI	KFSAA VLTS FLRMS KESFEERAKRQAQSP LAFKRAAARQLAALLSSVMKCMETHKLDPAKE	404
BrAFRIa	DPOFLKSIDLTLAARAVNAFKRRYDE LQSHMDYIGNAID SNLKTNGIIEIAAAS	105	BrAFRIa	VPGWQIKEQMAREKDIIVLDKRMEEARSISRMEEARSISRMEEARSISIREEAAISERLI	448
BrCFRIa	DPOFLKSIDLTLAARAVNAFKRRYDE LQSHMDYIGNAID SNLKTNGIIEIAAAS	97	BrCFRIa	VPGWQIKEQMAREKDIIVLDKRMEEARSISRMEEARSISRMEEA-----AISERLI	429
BrAFRIb	HPOFLKSIDLTLAARAVNAFKRRYDD LQSHMDYIGNAID SSKLKS KGITAESPS SRSQS P	103	BrAFRIb	VQGWQIKEQMIKLEKDIIVLDKRMGG-----EARSIS LMEEV-----ALTKRF	430
BrCFRIb	HPOFLKSIDLTLAARAVNAFKRRYDD LQSHMDYIGNAID SSKLKS KGITAESPS SRSQS P	103	BrCFRIb	VQGWQIKEQMIKLEKDIIVLDKRMGG-----EARSIS LMEET-----ALTKRF	438
ThFRI	HPOFMKSIDL LAKFSAAFDAFKRRYDD LQSHMDYIGNAID SSKLKS NGVDSSSHS	115	ThFRI	IPGWPIKEQIVKLEKDTLQIDKMEE-----QARSIS LMEEA-----VLTKRL	455
AlpFRI	QPOFLKSIDL LAAFSVAVEAFKRFDD LQKHIDSIENATE SKLKS NGAD LAASSN-FHQ P	111	AlpFRI	LPGWQIKEQIVNLEKDTLQIDKMEE-----KARSIS LMEEA-----VLAKRI	450
AllFRI	QPOFLKSIDL LAAFSVAVEAFKRFDD LQKHIDSIENATE SKLKS NGAD LAASSN-FHQ P	111	AllFRI	LPGWQIKEQIVNLEKDTLQIDKMEE-----KARSIS LMEEA-----VLAKRI	450
AtFRI	QPOFLKSIDL LAAFSVAVETFKRFDD LQKHIDSIENATE SKLESNGVVAARNNFHQP	111	AtFRI	LPGWQIKEQIVSLEKDTLQIDKMEE-----KARSIS LMEEA-----ALAKRM	447
BrAFRIa	PPOKNTAI-----ATAQOSPFE-----KSEARFCESSMAKELRRYMFVNI	148	BrAFRIa	YNQMKRPRLSMEMPPPTAAASYS PMYRDRHSFSPS HREGDADEISALVS SYLGPSSGFP	508
BrCFRIa	PPOKNTAI-----ATAQOSPFE-----KSEARLCESSMCKELRRYMFVNI	140	BrCFRIa	YNQMKRPRLSMEMPPPTAASYS PMYRDRH-SFPPS HREGDADEISALVS SYLGPSSGFP	488
BrAFRIb	RNDASGET-----VAATQSPFKETCEIV-----AEKVERLCELMCKGLRRYMYSNIS	151	BrAFRIb	YNQMKRPRLSMEMPPPAASSSYSSTYDFR-SFPPS HRD-----NEISALVS SYLGPSSGFP	486
BrCFRIb	RNDASGET-----VAATQSPFKETCEIV-----AEKVERLCELMCKGLRRYMYSNIS	157	BrCFRIb	YNQMKRPRLSMEMPPPAASSSYSSTYPAR-SFPPS HRD-----DEISALVS SYLGPSSGFP	494
ThFRI	EHDASREIA-----IVPPPEEAE TAFEMITSNDKAEGORLCELMCKGLRRYMYSNIS	172	ThFRI	YNQMKRPRLSMEMPPPAASSSYSSTYDRD-NESSHIDGRDEISALVS SYLGPSSGFP	514
AlpFRI	LLSPPRNNASVETTVLSQSSQEPAEIVPETS-----NKTEGERLCELMCKGLRRYMYSNIS	169	AlpFRI	YNQMKRPRLSMEMPPVAASSSYSSTYLDL-SFHSQRDEDRDEISALVS SYLGPSSGFP	509
AllFRI	LLSPPRNNASVETTVLSQSSQEPAEIVPETS-----NKTEGERLCELMCKGLRRYMYSNIS	169	AllFRI	YNQMKRPRLSMEMPPVAASSSYSSTYLDL-SFHSQRDEDRDEISALVS SYLGPSSGFP	509
AtFRI	MLSPPRNNSVETTVLSQSSQEPAEIVPETS-----NKTEGERLCELMCKGLRRYMYSNIS	166	AtFRI	YNQMKRPRLSMEMPPVTSSSYSSTYDRD-SFHSQRDDDRDEISALVS SYLGPSSGFP	506
BrAFRIa	DRAKLIEELIPGALKLAKDPKPFVLD CIGKFLQGRKAPAKDLPATITARKVSLLLILEQYLL	208	BrAFRIa	RSGLMRSPPEYVMPF-----GGLGRSVVA YDHL P NSYS-----PVHGQRHPQY	552
BrCFRIa	DRAKLIEELIPGALKLAKDPKPFVLD CIGKFLQGRKAPANDSPATITARKVSLLLILEQYLL	200	BrCFRIa	RSSLRRSPPEYVMPF-----GGLGRSVVA YDHP P NSYS P-----VSRYS PVHGQRHPQY	539
BrAFRIb	DRAKLIEELIPALKLAKEPANFVLE CIGKFLQGRKAYASDSHMI PARQVSLLLILEQYLL	217	BrAFRIb	RSSLRRSPPEY LAPS-----SGLGRSVVA YEHLP NSYS LP-----LPGRHS PVGQRHPQY	537
BrCFRIb	DRAKLIEELIPALKLAKEPANFVLE CIGKFLQGRKAYASDSHMI PARQVSLLLILEQYLL	217	BrCFRIb	RSSLRRSPPEY LAPP-----SGLGRSVVA YEHLP NSYS LP-----LPGRHS PVGQRHPQY	545
ThFRI	DRAKLIEELIPAGLKLAKEPANFVLE CIGKFLQGRKAFSHDSHMI PARQVSLLLILEQYLL	232	ThFRI	RSSLRRSPPEYVMPF-----GGLGRSVVA YEHLL P NSYS-----PVHGQRHPQY	558
AlpFRI	DRAKLIEELIP SALKLAKEPANFVLE CIGKFLQGRRAFTKESPMVSARQVSLLLILEQYLL	229	AlpFRI	RSSLRRSPPEYIVLPLPGGLGRSVVA YEHLP NSYS PGHGQRHPQYSPS PVHGQRHPQY	569
AllFRI	DRAKLIEELIP SALKLAKEPANFVLE CIGKFLQGRRAFTKESPMVSARQVSLLLILEQYLL	229	AllFRI	RSSLRRSPPEYIVLPLPGGLGRSVVA YEHLP NSYS PGHGQRHPQYSPS PVHGQRHPQY	569
AtFRI	DRAKLIEELIP SALKLAKEPANFVLD CIGKFLQGRRAFTKESPMVSARQVSLLLILEQYLL	226	AtFRI	RS---RRSPPEYVMPFPGGLGRSVVA YEHLL P NSYS PGHGQRHPQYSPS PVHGQRHPQY	564
BrAFRIa	TFDPEGRKKKLLVSVKDEAEAAAVAWKRLVGE GWLGAEAEMDARGLLLVACFGIPE	268	BrAFRIa	PPFVHGQHQMPYR-----LYRHSPSVERHLALSNIHRTFR-NLSDRIGG	596
BrCFRIa	TFDPEGRKKQ--VGSVKDEAEAAAVAWKRLVGE GWLGAEAEMDARGLLLVACFGIPE	258	BrCFRIa	SLPVHG-----LYRHSPSVERYLA LSNHRTFR-NLSDRIGG	576
BrAFRIb	MLDP-----KPPFDRVSIKQAEAAAVAWKRMSEGR LAAEAEMDARGLLLVACFGIPE	267	BrAFRIb	TPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSVERYLA LSKIRSPR-NS-----576	576
BrCFRIb	MLDPS-EKKPIDG-SIKDEAEAAAVAWKRMSEGR LAAEAEMDARGLLLVACFGIPE	275	BrCFRIb	SPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSVERYLA LSKIRSPR-NS-----585	585
ThFRI	MIEPGEGRVKSMIESVKDEAEAAAVAWKRLMSE GKLATAEMDARGLLLVACFGVPS	292	ThFRI	SPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSVERYLLT LPHRSPR-NSSSDRIGG	605
AlpFRI	MPDRG--GKVKIESCIKDEAETA AVAWKRLMSE GGLAAAEKMDARGLLLVACFGVPS	287	AlpFRI	SPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSEERYLG LSNHRSPRNS SLDPK-----614	614
AllFRI	MPDRG--GKVKIESCIKDEAETA AVAWKRLMSE GGLAAAEKMDARGLLLVACFGVPS	287	AllFRI	SPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSEERYLG LSNHRSPRNS SLDPK-----614	614
AtFRI	MPDRG--GKVKIESWIKDEAETA AVAWKRLMTE GGLAAAEKMDARGLLLVACFGVPS	284	AtFRI	SPPIHGQQQIPYG-LQRVYRHSPSEERYLG LSNRSPRNS SLDPK-----609	609
BrAFRIa	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIVGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	328	BrAFRIa	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIVGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	328
BrCFRIa	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIVGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	318	BrCFRIa	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIVGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	318
BrAFRIb	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIAALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGIED	327	BrAFRIb	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIAALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGIED	327
BrCFRIb	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIAALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGIED	335	BrCFRIb	SFKSMDDLIDLIRSGTAEIAALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKRGMHIEALEMVIYTFGIED	335
ThFRI	SFRSMDDLIDLIRSGTAEIAGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKGKGTNIEALEMVIYTFGMED	352	ThFRI	SFRSMDDLIDLIRSGTAEIAGALKRSPFLVPMMSGIVDSS IKGKGTNIEALEMVIYTFGMED	352
AlpFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	347	AlpFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	347
AllFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	347	AllFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	347
AtFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	344	AtFRI	NFRSMDDLIDLIRMSGNEIAGALKRSPFLVPMMSGIVESS IKRGMHIEALEMVIYTFGMED	344

C – область

Рис. 27. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b *Brassica* с гомологами гена FRIGIDA из видов Brassicaceae. BrAFRIa – BraA.FRIGIDA.a (AEJ81950); BrCFRIa - BolA.FRIGIDA.a (AFC68978); BrAFRIb - BraA.FRIGIDA.b (AFJ12105); BrCFRIb - BolC.FRIGIDA.b (AFC68979); ThFRI – *Thellungiella halophila*, AllFRI – *A. lyrata* subsp. *lyrata* (ABY51922); AlpFRI - *A. lyrata* subsp. *petraea* (ABY51891); AtFRI - *A. thaliana* (AF228499). Красная линия – домен Ffigida, черная линия - coiled-coil домен; **MEEARSIS** – аминокислотные повторы.

проанализированных последовательностей FRIGIDA обнаруживает наибольшую изменчивость. Как было ранее показано, у FRIGIDA из *A. thaliana* эта область необходима для физического взаимодействия с FRL1, приводящего к активации транскрипции *FLC* (Choi et al., 2011). В наших опытах для N-концевой области локусов FRIGIDA coiled-coil домен был предсказан с малой вероятностью (менее 0,05), равным образом у ранне- и у поздноцветущих форм *Brassica*. Однако встречаются и последовательности FRIGIDA.a и FRIGIDA.b, для которых образование этого домена предсказано с вероятностью 0,8 (см. рис. 19). Чтобы выявить полиморфизмы, которые могли бы повлиять на вероятность образования coiled-coil домена, мы провели сравнительный анализ полученных нами аминокислотных последовательностей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b *Brassica* (рис. 28). Оказалось, что для областей FRIGIDA.a и FRIGIDA.b, в которых coiled-coil домен предсказан с вероятностью 0,8, характерно наличие остатка глутаминовой кислоты (E). Замена этой аминокислоты в локусе FRIGIDA.a на глицин (G), приводит к уменьшению вероятности образования coiled-coil домена. Наличие глутаминовой аминокислоты (E) также характерно для соответствующей области у гомологов FRIGIDA Brassicaceae, где образование биспирального домена предсказано с высокой вероятностью. Этот факт можно объяснить тем, что высокое содержание противоположно заряженных аминокислотных остатков в coiled-coil доменах стабилизирует его посредством электростатических взаимодействий (McFarlane et al., 2009). В нашем случае замена остатка полярной отрицательно заряженной глутаминовой кислоты на остаток незаряженного глицина привело, вероятно, к снижению электростатического взаимодействия. Для локуса FRIGIDA.b в этой позиции характерен полярно заряженный лизин (K), который присутствует в coiled-coil доменах как с высокой и низкой вероятностью образования биспирального домена (см. рис. 27, рис. 28). Очевидно, для локуса

FRIGIDA.b замена аминокислоты в этой позиции не является критичной для образования coiled-coil домена.

```
BjuA.FRIGIDA.a (KC937068*) + DLTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIENAIIDSN
BraA.FRIGIDA.a (AEJ81950) - DLTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSN
BcaC.FRIGIDA.a (AFC68976) - DLTALAAAVDAFKRRYDELQSHMDYIGNAIDSN
BolC.FRIGIDA.a (AFC90010) + DLTALAAAVNAFKRRYDELQSHMDYIENAIIDSN
BolC.FRIGIDA.a (AFC68978) + DLTALAAAVNAFKRRYDELQSHMDYIENAIIDSN
BolC.FRIGIDA.b (AFC68979) - DLTAFAAAMDALFKRHYDDLQNHMDYIKNAIGSS
```

Рис. 28. Множественное выравнивание участков белка FRIGIDA, соответствующих coiled-coil домену в N-концевой области. «+» - образование домена с вероятностью 0,8; «-» - образование домена с вероятностью менее 0,05. Серым выделены гомологичные области, темно-серым – аминокислотные остатки, замены в которых приводят к изменению вероятности образования coiled-coil домена.

Wang и соавторы (Wang et al., 2011) обнаружили такую же замену глутаминовой кислоты (E) на глицин (G), которая привела к уменьшению вероятности образования coiled-coil домена в N-концевой области с 0,5 до 0,05. Наличие глутаминовой кислоты было характерно для аллелей *FRIGIDA* озимого типа, а наличие глицина – для аллелей полуозимого типа. Примечательно, что однонуклеотидная замена (SNP254) E→G была связана с изменениями во времени перехода к цветению. Однако такая корреляция была обнаружена в эксперименте одного года, а в два последующих года эту связь не удалось обнаружить. Исходя из этого, Wang и соавторы предположили, что полиморфизм в биспиральном домене N-концевой области *BnaA.FRIGIDA.a* способствует функциональному различию между аллелями *FRIGIDA* озимого и полуозимого типа в исследуемой популяции, а также может играть роль в природной изменчивости, по крайней мере, в некоторых условиях окружающей среды.

Однако результаты анализа полученных нами последовательностей *FRIGIDA.a* из фенотипически контрастных форм не дают основания для такого вывода. С одной стороны, остаток глицина найден в биспиральном домене N-концевой области у *FRIGIDA.a* из двулетней формы *B. rapa* Chifu и у «упрямых» форм *B. rapa*, которые должны зацвести в первый год, но не

зацвели. С другой стороны, такая замена обнаружена у FRIGIDA.a из субгенома А двулетней формы *B. napus*, где наблюдалось преждевременное цветение (см. рис. 21). При сравнительном анализе растений *B. rapa*, которые резко различаются по времени зацветания в отсутствие холодового воздействия, мы не обнаружили существенных различий в строении последовательностей FRIGIDA.a. Это обстоятельство можно интерпретировать двояко: (1) критический для данного признака участок гена находится за пределами исследованной последовательности, возможно, в регуляторных элементах гена; (2) проявление уникальных для этих форм признаков, связанных с регуляцией перехода к цветению, контролируется генами, отличными от *FRIGIDA*.

Исходя из представленных результатов, можно сделать вывод, что белок FRIGIDA культурных видов *Brassica* может выполнять те же функции, что и FRIGIDA у *Arabidopsis*. Однако функциональное значение отдельных участков этого белка требует дальнейшего изучения.

4.3. Возникновение двух локусов гена *FRIGIDA* в семействе Brassicaceae в контексте эволюции геномов *Arabidopsis* и линий *Brassica*

Эволюция геномов *Brassica* – хорошо известный пример палеоплоидии с последующим фракционированием и неофункционализацией генома (Lysak et al., 2005; Tang et al., 2012). Принято считать, что 20 – 30 млн. лет назад произошла дивергенция двух линий (lineages) Brassicaceae: линии I, включающей трибу Camelinae с родом *Arabidopsis* Heynh., и линии II, которая включает трибу Brassiceae с родом *Brassica* L. Вслед за этим событием, 13 – 17 млн. лет назад произошла трипликация всего генома *Brassica* и фракционирование генома с выделением линии с геномами А/С и линии с геномом В. Вероятно, у диплоидного предшественника *B. rapa* и *B. oleracea* 2,5 – 4,2 млн. лет тому назад, произошла дивергенция геномов А и С (Cheung et al., 2009; Couvreur

et al., 2010; Franzke et al., 2011; Warwick and Sauder, 2005). *A. thaliana* и *A. lyrata* разошлись приблизительно 5 млн. лет назад (Kuittinen et al., 2011).

Филогенетический анализ доступных последовательностей *FRIGIDA* дает результаты, хорошо согласующиеся с этими представлениями об истории геномов Brassicaceae (рис. 29). Отчетливо разделяются линии Brassicaceae I и II, трибы внутри каждой линии и локусы *FRI.a* и *FRI.b* в пределах рода *Brassica*, а однолетний вид *A. thaliana* с его редуцированным геномом отделен от тетраплоида *A. lyrata*.

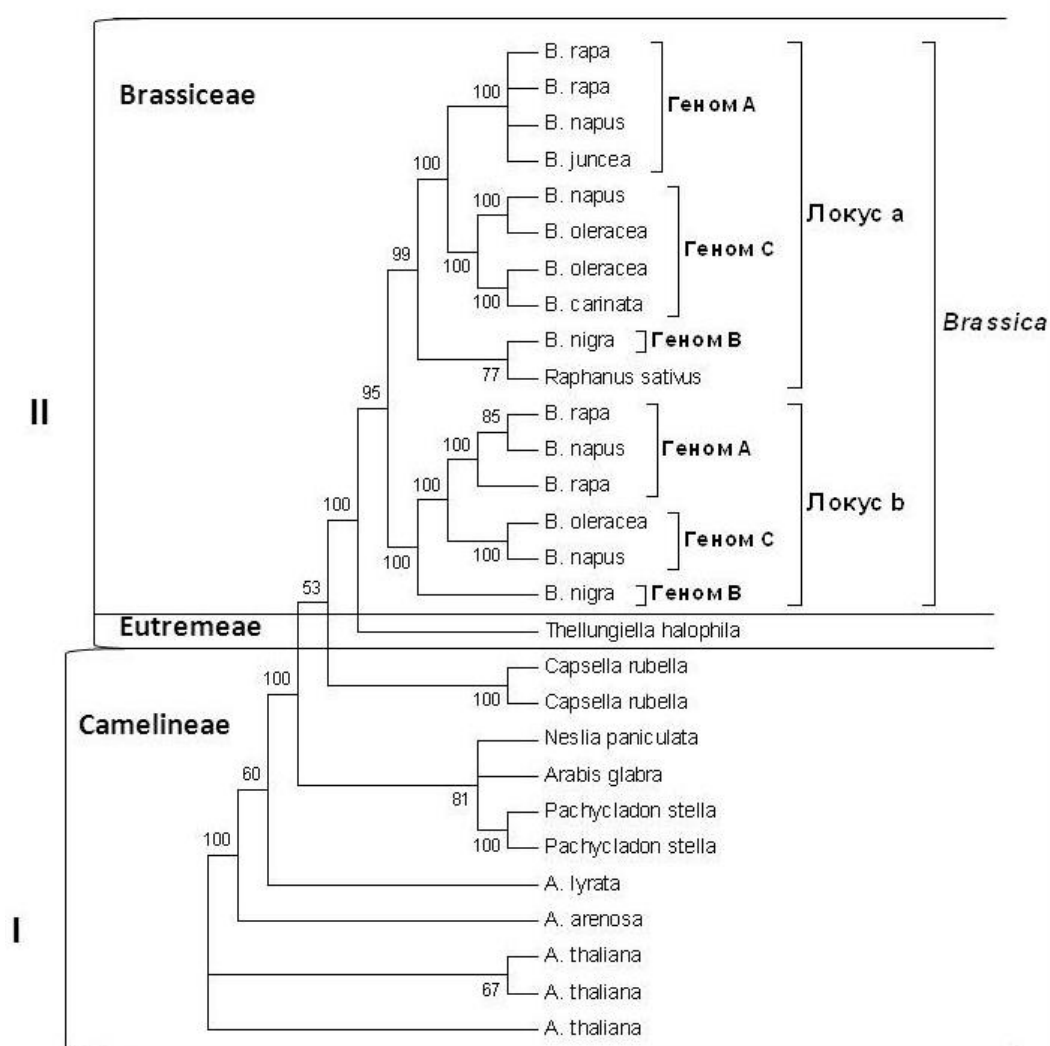


Рис. 29. Дендрограмма гомологов *FRIGIDA* у видов *Brassicaceae*. Алгоритм Maximum Likelihood; bootstrap рассчитан для 1000 повторов. Дерево укоренено относительно нуклеотидной последовательности *FRIGIDA* из *A. thaliana* H51 (AF228499).

Аллотетраплоид *B. napus* появился совсем недавно, вероятно, менее 10 тыс. лет назад (Cheung et. al., 2009), и это обстоятельство могло бы объяснить консерватизм двух локусов *FRIGIDA* в геномах А и С *B. rapa* and *B. oleracea* и в соответствующих субгеномах тетраплоида. К сожалению, мы не знаем времени возникновения двух других аллотетраплоидов, *B. juncea* и *B. carinata*, где последовательности А и С, присущие диплоидам, также сохраняются с высокой степенью сходства.

Возможно, геном В *Brassica* сходен с большинством исследованных форм Brassicaceae, где этот ген представлен только одним локусом. Если *B. rapa*, *B. oleracea* и производный тетраплоид *B. napus* являются исключением из общего правила, то приходится допустить, что локус *FRI.b* возник уже после расхождения линий А/С (the *rapa/oleracea* lineage) и В (the *nigra* lineage), но еще до дивергенции геномов А и С, у их общего палеополиплоидного предка (Tang et. al., 2012). Если локус *FRI.b* действительно участвует в регуляции перехода к цветению, можно предположить, что он сохранился в линии А/С в связи с особенностями фракционирования дублицированных генов у *B. rapa* и *B. oleracea*, эволюция которых происходила в более прохладных климатических условиях, а в последние 10 тыс. лет - и под сильным давлением искусственного отбора. В пользу такого предположения говорит избирательное сохранение у *B. rapa* множественных копий *FLOWERING LOCUS C* как ключевого гена перехода к цветению, критичного для адаптации к условиям внешней среды (Tang et al., 2012).

Двухлокусная модель *FRIGIDA* доказана для геномов А и С растений *Brassica*: в случае *B. oleracea*, локусы *BolC.FRI.a* и *BolC.FRI.b* картированы, соответственно, на хромосомах С3 и С9, а в случае *B. rapa*, скаффолды, в состав которых входят гены *BraA.FRI.a* and *BraA.FRI.b*, локализованы, соответственно, на хромосомах А3 и А4. Мы не располагаем аналогичными данными для генома В, однако отчетливый диморфизм этого гена позволяет

предполагать, что и в этом случае ген *FRIGIDA* представлен двумя локусами на разных хромосомах - или двумя локусами на одной хромосоме, возникшими в результате тандемной дупликации, как это показано для двух локусов *FLOWERING LOCUS C* у *A. lyrata* (L.). (Nah and Chen, 2010).

Дупликация генов является основным механизмом возникновения новых функций гена и для появления эволюционных новообразований, значимых для адаптации растений в новых условиях (Flagel and Wendel, 2009; Rensing, 2014; Soltis et al., 2009). Дупликация генов возникает в результате удвоения всего генома (whole-genome duplication, WGD), локальной тандемной дупликации или посредством ретротранспозонов. Тандемно дуплицированные гены относительно моложе, чем гены, возникшие в результате WGD. Известно, что в геноме *A. thaliana* дуплицировано 16% генов. Со временем тандемные дубликаты генов могут быть утеряны или могут приобрести новые функции (Lynch and Conery, 2003), эти процессы известны как неофункционализация и субфункционализация (Lynch and Force, 2000). Подобные изменения могут происходить посредством модификаций в кодирующей области гена и/или в некодирующих регуляторных последовательностях, которые связаны с экспрессией гена. Таким образом происходит увеличение/уменьшение количества копий гена (рис. 30А). Удвоение всего генома сыграло важную роль в эволюции семейства Brassicaceae. Геном общего предка Brassicaceae прошел три цикла WGD, которые сопровождались значительными внутри- и межхромосомными перестройками (Fang et al., 2012; Hofberger et al., 2013). В настоящее время общепринятой является простая система из 24 консервативных хромосомных блоков (А-Х), перестановка которых позволяет моделировать структуру геномов представителей семейства Brassicaceae (Schranz et al., 2006). Используя эту систему, Irwin и соавторы (Irwin et al., 2012) предложили следующую модель возникновения двух локусов *FRIGIDA* у *B. oleracea* (рис. 30Б). Предковые геномные блоки QR и WX хромосом АК6 и АК8, которые в настоящее время обнаруживаются в

геноме *A. lyrata*, были рекомбинированы еще до трипликации генома предка *Brassica*, в результате чего в геноме *B. rapa* блок WR оказался представлен три раза на хромосомах A2, A3 и A10. Паралогичные области в геноме *B. oleracea* представлены на хромосомах C2, C3 и C9. Таким образом, последовательности *FLOWERING LOCUS C* (блок R) и *FRIGIDA* (блок W) были перенесены на эти хромосомы: локусы *BolC.FRI.a* и *BolC.FRI.b* картированы на хромосомах C3 и C9, а локус *FRIGIDA* из третьей паралогичной области на хромосоме C2, вероятно, был утерян во время эволюции *B. oleracea*. В результате такого переноса нынешнее местоположение локуса *FRIGIDA* на вершине хромосомы 4 у *A. thaliana*, в блоке, гомологичном блоку O в хромосоме 6 предкового кариотипа, отличается от локализации *FRIGIDA* у видов *Brassica*.

Irwin и соавторы (Irwin et al., 2012) также предполагают, что хромосомные перестройки, произошедшие во время эволюции генома *A. thaliana*, переместили геномную область, содержащую локус *AtFRI*, на край короткого плеча хромосомы 4, оставив фрагмент второго локуса *FRIGIDA* в области нижнего плеча хромосомы 5. Этот фрагмент обнаруживает высокую гомологию с интроном 1 и экзоном 3 гена *FRIGIDA* у других представителей Brassicaceae (*A. lyrata*, *B. oleracea*) (Yogeeswaran et al., 2005).

Интересно, что все полученные нами нуклеотидные последовательности *FRI.a* больше похожи на *FRIGIDA* из *A. thaliana*, а последовательности *FRI.b* – на *FRIGIDA* из *A. lyrata*. Возникает вопрос, были ли у *Arabidopsis* изначально один локус *FRIGIDA* или один из локусов был утерян в ходе эволюции?

Можно предположить три возможных пути образования двух локусов *FRIGIDA* у *Brassica* (рис. 31). Первая модель предполагает, что у *Arabidopsis* изначально был один локус *FRIGIDA*, а у *Brassica* – два (рис. 31A). Вторая модель исходит из предположения о том, что дупликация произошла у

линии Brassica A/C уже после отделения от линии Brassica B, где остался только один локус *FRIGIDA* (рис. 31Б).

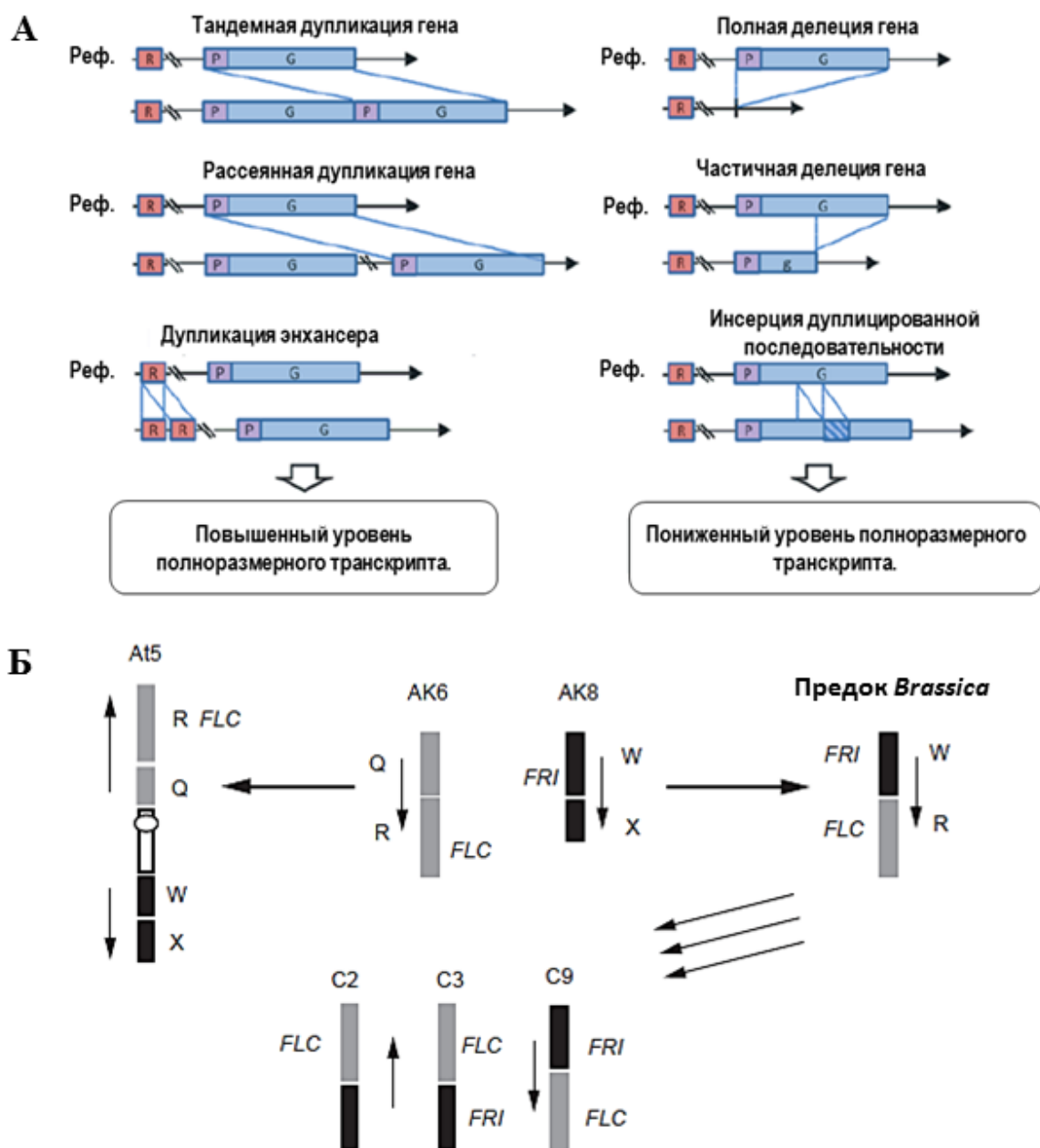


Рис. 30. (А) Варианты изменения количества копий генов, произошедших в результате геномных перестроек. R – энхансер, P – промотор, G – ген. Реф. – референсная последовательность гена (по Żmieńko et al., 2014). (Б) Предположительная модель возникновения двух локусов *FRIGIDA* у *B. oleracea* (по Irwin et al., 2012).

Третья модель допускает, что у общего предка Brassicaceae изначально было два локуса, затем у *Arabidopsis* один из локусов *FRIGIDA* был утерян в

ходе эволюции, а у *Brassica* осталось два локуса (рис. 31В). Третий путь кажется нам наиболее вероятным. Известно, что уменьшение генома *A. lyrata* ($n=8$) привело к образованию генома *A. thaliana* ($n=5$). Редукция

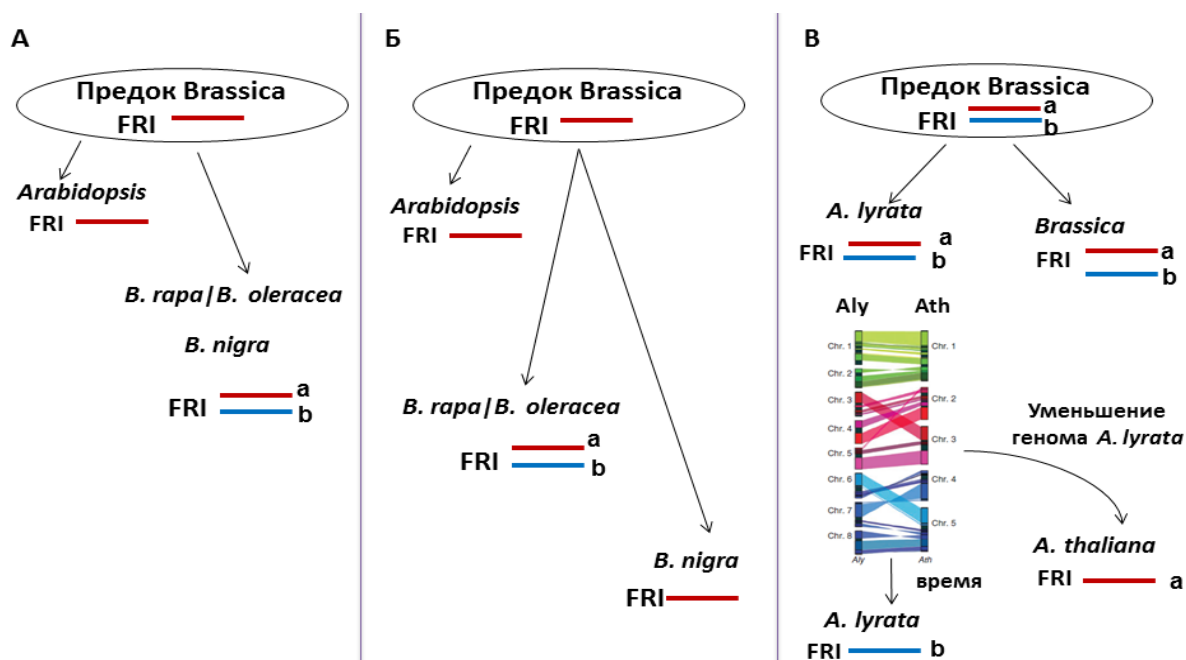


Рис. 31. Возможные пути образования двух локусов *FRIGIDA* у *Brassica*. Aly – *A. lyrata*, Ath – *A. thaliana*, FRI – *FRIGIDA*. a – локус *FRIGIDA.a*, b – локус *FRIGIDA.b*.

генома *A. lyrata* произошла в результате внутри- и межхромосомных перестроек и делеций небольших фрагментов хромосом по всему геному, в кодирующих и в некодирующих областях (Hu et. al., 2011). На основании системы из 24 консервативных хромосомных блоков смоделирована и изучена структура геномов *A. thaliana* и *A. lyrata* (Schranz et. al., 2006). Установлено, что ген *FRIGIDA* (At4g00650) у *A. thaliana* картирован на четвертой хромосоме в блоке O (At400630-At4g04955), а у *A. lyrata* на восьмой хромосоме в блоке W. Блок W (At5g49430-At5g60390), гомологичный восьмой хромосоме предкового кариотипа, в современном геноме *A. thaliana* расположен в области пятой хромосомы, а в геноме *A. lyrata* – в соответствующей области на восьмой хромосоме (Schranz et. al., 2006). Именно в блоке W пятой хромосомы *A. thaliana* находится фрагмент

(At5g51090) гомологичный первому интрону и третьему экзону гена *FRIGIDA* из *A. lyrata* (Kuittinen et al., 2004; Yogeewaran et al., 2005).

Суммируя эти данные, можно предположить, что в процессе отделения от *A. lyrata* в геноме *A. thaliana* сохранился только один из дублированных генов, соответствующий *FRI.a Brassica*, а у *A. lyrata* со временем остался только дубликат, соответствующий локусу *FRI.b Brassica*. Возможно, у общего предка Brassicaceae ген *FRIGIDA* был дублирован и сохранился у линий Arabidopsis и Brassica, а со временем один локус *FRIGIDA* у линии Arabidopsis был утерян (рис. 32).

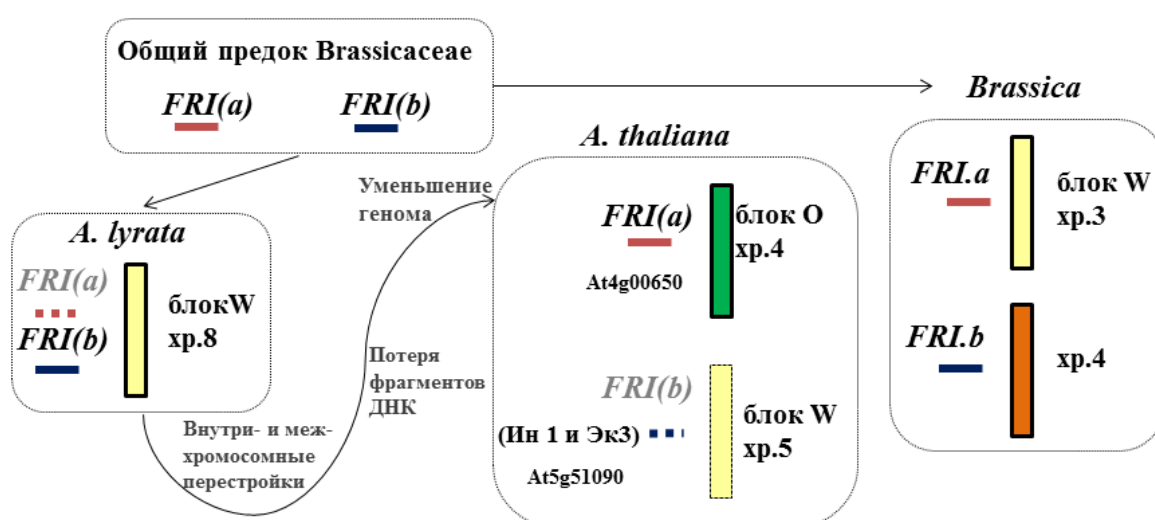


Рис. 32. Возможное соответствие дубликатов локуса *FRIGIDA* у *Arabidopsis* и *Brassica*. Хр. – хромосома. *FRI(a)* и *FRI(b)* – возможные дублированные локусы *FRIGIDA* у общего предка Brassicaceae, *FRI(a)* и *FRI(b)* – предположительно утерянные локусы *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b* у *Arabidopsis*. *FRI.a* и *FRI.b*. Синей пунктирной линией обозначен фрагмент, гомологичный первому интрону и третьему экзону *FRIGIDA A. lyrata*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении гена *FRIGIDA* у культурных видов *Brassica* в качестве гена-кандидата был выбран ген *A. thaliana*. На основании множественного выравнивания найденных *in silico* последовательностей гена *FRIGIDA* из культурных видов *Brassica* созданы локус-специфичные праймеры. С помощью этих праймеров из геномов *Brassica* были клонированы локусы *FRI.a* и *FRI.b*, и проведен подробный анализ полученных последовательностей.

Присутствие двух локусов *FRIGIDA* отличает культурные виды *Brassica* от *A. thaliana* с одним локусом *FRIGIDA*. Оба локуса *FRIGIDA* представлены у видов *Brassica* аллельными формами, специфичными для геномов А, В и С. Как и у *A. thaliana*, все последовательности локусов *FRI.a* и *FRI.b* включают три экзона и два интрона. Аминокислотные последовательности белка *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b* содержат центральный консервативный домен *Frigida* и специфичные N- и C-концевые области, важные для функциональной активности белка. В C-концевой области *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b* в геномах и субгеномах *Brassica* сохраняется coiled-coil домен, необходимый для белок-белкового взаимодействия с участниками комплекса FRI-C. Для N-концевой области образование такой структуры было предсказано только для *FRIGIDA.a* генома и субгенома С у *B. oleracea*, *B. carinata* и субгенома А у *B. juncea*. Исходя из этого, можно предположить, что наличие или отсутствие coiled-coil домена в этой области не является критичным для функциональной активности белков *FRIGIDA*.

Двухлокусная модель *FRIGIDA* доказана для геномов А и С растений *Brassica*. В случае *B. rapa*, скаффолды, в состав которых входят *FRI.a* и *FRI.b* локализованы на хромосомах А3 и А4. Для *B. oleracea* локусы *FRI.a* и *FRI.b* картированы на хромосомах С3 и С9 (Irwin et. al., 2012). Для *B. nigra* (геном В) аналогичных данных нет. Однако отчетливый диморфизм этого гена позволяет предполагать, что ген *FRIGIDA* в геноме В также

представлен двумя локусами на разных хромосомах или двумя локусами на одной хромосоме, возникшими в результате тандемной дупликации, как это показано для двух локусов *FLOWERING LOCUS C* у *A. lyrata* (Nah and Chen, 2010, Kemi et. al., 2013).

Сравнительный анализ показал, что последовательности локусов гена *FRIGIDA* и продуктов их трансляции, характерные для геномов А, В и С диплоидов *B. rapa*, *B. nigra* и *B. oleracea*, сохраняются с высокой степенью консервативности (95-99 %) в субгеномах А, В и С трех аллотетраплоидных видов, *B. carinata*, *B. juncea* и *B. napus*.

Мы показали, что для последовательностей локусов *FRI.a* и *FRI.b* всех геномов и субгеномов *Brassica* наиболее консервативной является область второго экзона, а наиболее варибельными – области, соответствующие С- и N-концевым участкам гена. Детальный анализ распределения несинонимичных и синонимичных замен вдоль кодирующей части гена *FRIGIDA* выявил заметные различия между локусами *FRI.a* и *FRI.b* и между различными участками гена. Возможно, мы обнаружили «горячие точки» в строении этого гена, с которыми связаны его эволюционные и функциональные изменения после дупликации (Doebley and Lukens, 1998; Rensing, 2014).

На основании локус-специфичных полиморфизмов, характерных для геномов А, С и В *Brassica*, созданы локус- и геном-специфичные маркеры *FRIGIDA*. Эти маркеры могут быть использованы для изучения структурного и функционального полиморфизма гена *FRIGIDA*, для картирования гена *FRIGIDA* и уточнения связи этого гена с локусом признака время перехода к цветению, а также применены в селекции культурных видов *Brassica* на скороспелость.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлены сравнительные особенности строения белка FRIGIDA у шести видов *Brassica*: последовательности FRIGIDA отличаются от прототипа у *A. thaliana* отсутствием coiled-coil домена в N-концевой области; геном-специфичные варианты FRIGIDA у видов *Brassica* различаются строением и числом характерных повторов в C-концевой области.
2. У трех геномов *Brassica* ген *FRIGIDA* представлен двумя локусами.
3. Сравнительный анализ локусов *FRIGIDA* у диплоидов *Brassica* (AA, CC, BB) и производных тетраплоидов (AABB, AACC и BBCC) обнаружил высокую консервативность этого гена.
4. Созданы и верифицированы локус- и геном-специфичные маркеры *FRIGIDA*, пригодные для картирования и функционального анализа этого гена.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Аксенова Н.П., Миляева Э.Л., Романов Г.А. (2006). Флориген обретает молекулярный облик. К 70-летию теории гормональной регуляции цветения. Физиол. растений, 53, 449-454.
2. Жуковский П.М. (1971). Культурные растения и их сородичи: Систематика, география, цитогенетика, иммунитет, экология, происхождение, использование. — Изд. 3-е, перераб. и доп. Колос, Л., 752 с.
3. Медведев С. С., Физиология растений. – СПб.: Изд-во СПбУ, 2004, 336 с.
4. Чайлахян М.Х. (1937) Гормональная теория развития растений. М. Изд-во АН СССР, 198 с.
5. Adams S., Allen T., Whitelam G.C. (2009). Interaction between the light quality and flowering time pathways in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 60, 257-267.
6. Adrian J., Torti S., Turck F (2009). From decision to commitment: the molecular memory of flowering // *Mol. Plant.* 2, 628-642.
7. Alonso-Blanco C, Aarts MG, Bentsink L, Keurentjes JJ, Reymond M, et al. (2009) What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *Plant Cell*, 21, 1877–1896.
8. Amasino R. (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell*, 16, 2553-2559.
9. Andrés F., Coupland G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Rev. Genet.*, 13, 627-639.
10. Atwell S., Huang Y.S., Vilhjalmsson B.J. et al. (2010). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*, 465, 627–631.
11. Balasubramanian S., Sureshkumar S., Agrawal M. et al. (2006). The *PHYTOCHROME C* photoreceptor gene mediates natural variation in

- flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. Nat. Genet., 38, 711–715.
12. Blackman B. K., Scascitelli M., Kane N. C. et al. (2011). Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 108, 14360-14365.
 13. Blazquez M.A., Ahn J.H., Weigel D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Genet. 33, 168–171.
 14. Brachi B., Faure N., Horton M. et al. (2010). Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. PloS Genet. 6: e1000940.
 15. Brachi B., Faure N., Bergelson J. et al. (2013a). Genome-wide association mapping of flowering time in *Arabidopsis thaliana* in nature: genetics for underlying components and reaction norms across two successive years. Acta Bot. Gallica, 160, 205-219.
 16. Brachi B., Villoutreix R., Faure N. et al. (2013b). Investigation of the geographical scale of adaptive phenological variation and its underlying genetics in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Ecology, 22, 4222-4240.
 17. Branca F., Cartea E. (2011). *Brassica*. In: Kole C. (ed.), Wild crop relatives: genomic and breeding resources, Oilseeds. Springer, Heidelberg a.o., p. 17-36.
 18. Caicedo A.L., Stinchcombe J.R., Olsen K.M. et al. (2004). Epistatic interaction between *Arabidopsis FRI* and *FLC* flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 101, 15670–15675.
 19. Campoli C., Drosse B., Searle I. et al. (2011). Functional characterisation of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS*. Plant J., 69, 868–880.

20. Campbell, M. A., Haas, B. J., Hamilton J. P. et al. (2006). Comprehensive analysis of alternative splicing in rice and comparative analyses with *Arabidopsis*. *BMC genomics*, 7(1), 327.
21. Cardone M., Mazzoncini M., Menini S., et al. (2003). *Brassica carinata* as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: agronomic evaluation, fuel production by transesterification and characterization. *Biomass Bioenergy*, 25, 623-636.
22. Cheung F., Trick M., Drou et al. (2009). Comparative analysis between homoeologous genome segments of *Brassica napus* and its progenitor species reveals extensive sequence-level divergence. *Plant Cell*, 21, 1912–1928.
23. Chèvre A.M., Brun H., Eber F. et al. (2008). Stabilization of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* - *B. juncea* recombinant lines and its introgression into spring-type *Brassica napus*. *Plant Disease*, 92, 1208-1214.
24. Choi J., Hyun Y., Kang M.J et al. (2009). Resetting and regulation of Flowering Locus C expression during *Arabidopsis* reproductive development. *Plant J.*, 57, 918-931.
25. Choi K., Kim J., Hwang H.J. et al. (2011). The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. *Plant Cell*, 23, 289-303.
26. Churchill G. A., Doerge R.W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963-971.
27. Churbanov A., Winters-Hilt S., Koonin E.V., Rogozin, I.B. (2008). Accumulation of GC donor splice signals in mammals. *Biol. Direct*, 3, 30.
28. Clarke J., Dean C. (1994). Mapping *FRI* - a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 81-89.

29. Cockram J., Jones H., Leigh F.J. et al. (2007). Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J. Exp. Bot.*, 58, 1231–1244.
30. Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.
31. Corbesier L., Vincent C., Jang S. et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, 316, 1030-1033.
32. Cortijo S., Wardenaar R., Colomé-Tatché M. et al. (2014). Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science*, 343, 1145-1148.
33. Couvreur T.L., Franzke A., Al-Shehbaz I.A. et al. (2010). Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.*, 27, 55-71.
34. De Lucia F, Dean C (2011) Long non-coding RNAs and chromatin regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14, 168–173.
35. De Lucia F., Crevillen P., Jones A.M. et al. (2008). A PHD polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 16831-16836.
36. Ding L., Kim S.Y., Michaels S.D. (2013). *FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR* family proteins regulate *FLOWERING LOCUS C* expression in both winter-annual and rapid-cycling Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 163, 243-252.
37. Dixon G.R. (2007). *Vegetable Brassicas and related crucifers*. CAB Intern., Wallingford, 327p.
38. Doebley J.F., Gaut B.S., Smith, B.D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127, 1309-1321.
39. Doebley J., Lukens L. (1998). Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell*, 10, 1075-1082.

40. Ehrenreich I., Hanzawa Y., Chou L. et al. (2009). Candidate gene association mapping of *Arabidopsis* flowering time. *Genetics*, 183, 325–335.
41. Fang L., Cheng F., Wu J., Wang X. (2012). The impact of genome triplication on tandem gene evolution in *Brassica rapa*. *Frontiers Plant Sci.*, 3, 281.
42. Filichkin S.A., Priest H.D., Givan S.A. et al. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, 20, 45-58.
43. Flagel L.E., Wendel, J.F. (2009). Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol.*, 183, 557-564.
44. Geraldo N., Bäurle I., Kidou S. et al. (2009) FRIGIDA delays flowering in *Arabidopsis* via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap-binding complex. *Plant Physiol.*, 150, 1611-1618.
45. Getinet A., Rakow G., Downey R.K. (1996). Agronomic performance and seed quality of Ethiopian mustard in Saskatchewan. *Can. J. Plant Sci.*, 76, 387-392.
46. Grillo M.A., Li C., Hammond M., Wang L., Schemske D.W. (2013). Genetic architecture of flowering time differentiation between locally adapted populations of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 197, 1321–1331.
47. Halliday K.J., Salter M.G., Thingnaes E., Whitelam G.C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J.*, 33, 875–885.
48. Hartmann U., Höhmann S., Nettekheim K. et al. (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 21, 351-360.
49. Hedden P., Thomas S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.*, 444, 11-25.

50. Hofberger J. A., Lyons E., Edger P. P. et al. (2013). Whole genome and tandem duplicate retention facilitated glucosinolate pathway diversification in the mustard family. *Gen. Biol. Evol.*, 5, 2155-2173.
51. Hoffmann M.H. (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *J. Biogeogr.* 29, 125–134.
52. Hu T. T., Pattyn P., Bakker E. G. et al. (2011). The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat. Genet.*, 43, 476-481.
53. Hurst L. D. (2002). The d / K ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet.*, 18, 486-487.
54. Ietswaart R., Wu Z., Dean C. (2012). Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends Genet.*, 28, 445-453.
55. Irwin J.A., Lister C., Soumpourou E. et al. (2012). Functional alleles of the flowering time regulator *FRIGIDA* in the *Brassica oleracea* genome. *BMC Plant Biol.*, 12, 21.
56. Itoh H., Nonoue Y., Yano M., Izawa T. (2010). A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice. *Nat. Genet.* 42, 635-639.
57. Izawa T. (2007). Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in *Arabidopsis* and rice. *J. Exp. Bot.*, 58, 3091–3097.
58. Jeong G.T., Park D.H. (2006). Batch (one- and two-stage) production of biodiesel fuel from rapeseed oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 131, 668-679.
59. Jiang D., Gu X., He Y. (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via *FRIGIDA*-mediated histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 1733-1746.
60. Johanson U., West J., Lister C. et al. (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science*, 290, 344-347.

61. Jung C., Müller A.E. (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.*, 14, 563-573.
62. Kim D.H., Doyle M.R., Sung S., Amasino R.M. (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.*, 25, 277-299.
63. Kim D.H., Song S. (2014). Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book*. Amer. Soc. Plant Biol., 12.
64. Kim E.D., Sung S. (2012). Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. *Trends Plant Sci.* 17, 16–21
65. Kim J.J., Lee J.H., Kim W. et al. (2012). The miR156-SPL3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FT* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 159, 461–478.
66. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M., Soppe W. (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 345–370.
67. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 141–172.
68. Kuittinen H., de Haan A.A., Vogl C. et al. (2004). Comparing the linkage maps of the close relatives *Arabidopsis lyrata* and *A. thaliana*. *Genetics*, 168, 1575-1584.
69. Kuittinen H., Niittyvuopio A., Rinne P., Savolainen O. (2008). Natural variation in *Arabidopsis lyrata* vernalization requirement conferred by a *FRIGIDA* indel polymorphism. *Mol. Biol. Evol.*, 25, 319-329.
70. Le Corre V. (2005) Variation at two flowering time genes within and among populations of *Arabidopsis thaliana*: comparison with markers and traits. *Mol. Ecol.*, 14, 4181–4192.
71. Le Corre V., Roux F., Reboud X. (2002). DNA polymorphism at the *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous

- variation is consistent with local selection for flowering time. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1261–1271.
72. Lee J.H., Yoo S.J., Park S.H. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Devel.* 21, 397–402.
 73. Levy Y.Y, Dean C. (1998). The transition to flowering. *Plant Cell*, 10, 1973–1990.
 74. Lovell J.T, Juenger T.E., Michaels S.D. et al. (2013). Pleiotropy of *FRIGIDA* enhances the potential for multivariate adaptation. *Proc. Royal Soc., ser. B. Biol. Sci.*, 280.
 75. Lynch M., Conery J. S. (2003). The evolutionary demography of duplicate genes. *J. Struct. Funct. Genomics*, 3, 35-44.
 76. Lynch M., Force A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, 154, 459-473.
 77. Lysak M.A., Koch M., Pecinka A., Schubert I. (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res.*, 15, 516–525.
 78. Matthew W., Jr. (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol. Biol.*, 80, 3–16.
 79. McFarlane A.A., Orriss G.L., Stetefeld J. (2009). The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems. *Eur. J. Pharmacol.*, 625, 101–107.
 80. McKay J.K., Richards J.H., Mitchell-Olds T. (2003). Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*: Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol. Ecol.*, 12, 1137-1151.
 81. Mendez-Vigo B., Pico F.X., Ramiro M. et al. (2011). Altitudinal and climatic adaptation is mediated by flowering traits and *FRI*, *FLC*, and *PHYC* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 157, 1942-55.
 82. Michaels S.D., Amasino R.M. (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11, 949-956.

83. Michaels S.D., Amasino R.M. (2000). Memories of winter: vernalization and competence to flower. *Plant, Cell Envir.*, 23, 1145-1153.
84. Michaels S.D., Amasino R.M. (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, 13, 935-941.
85. Michaels S.D., Ditta G., Gustafson-Brown C. et al. (2003). *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J.*, 33, 867–874.
86. Michaels S.D., Bezerra I.C., Amasino R.M. (2004). *FRIGIDA*-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101, 3281-3285.
87. Michaels S.D. (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, 75-80.
88. Moghaddam M.R.B., Van den Ende W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J. Exp. Bot.*, 64, 1439-1449.
89. Mouradov A., Cremer F., Coupland G. (2002). Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14 (Suppl. 1), S111-S130.
90. Nagano T., Fraser P. (2011) No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell*, 145, 178–181.
91. Nagaharu U. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J. Bot.*, 7, 389-452.
92. Nah G., Chen J.Z. (2010). Tandem duplication of the *FLC* locus and the origin of a new gene in *Arabidopsis* related species and their functional implications in allopolyploids. *New Phytol.*, 186, 228-238.
93. Navabi Z.K., Huebert T., Sharpe A.G. et al. (2013). Conserved microstructure of the Brassica B Genome of *Brassica nigra* in relation to

- homologous regions of *Arabidopsis thaliana*, *B. rapa* and *B. oleracea*. BMC Genomics, 14, 250.
94. Nei M., Li W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 5269-5273.
 95. Olsen K.M., Wendel J.F. (2013). A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes. Annu. Rev. Plant Biol., 64, 47-70.
 96. Ostergaard, L., King, G. (2008). Standardized gene nomenclature for the *Brassica* genus. Plant Methods, 4, 10.
 97. Panjabi P., Jagannath A., Bisht N. et al. (2008). Comparative mapping of *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana* using intron polymorphism (IP) markers: homeologous relationships, diversification and evolution of the A, B and C *Brassica* genomes. BMC Genomics, 9, 113.
 98. Parkin I.A., Gulden S.M., Sharpe A.G. et al. (2005). Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. Genetics. 2005, 171, 765-781.
 99. Parkin I.A., Lydiate D.J., Trick M. (2002). Assessing the level of collinearity between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* for *A. thaliana* chromosome 5. Genome, 45, 356-366.
 100. Pin P.A., Zhang W., Vogt S.H. et al. (2012). The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. Curr. Biol. 22, 1095–1101.
 101. Prakash S., Bhat S.R., Quiros C.F. et al. (2009). *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution. Plant Breeding Rev., 31, 21-187.
 102. Putterill J., Laurie R., Macknight R. (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. BioEssays, 26, 363–373
 103. Rakow G. (2004). Species origin and economic importance of *Brassica*. In: Pua E.C. and Douglas C.J. (eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, Berlin – Heidelberg, pp. 3-11.

104. Raman H., Raman R., Eckermann P. et al. (2013). Genetic and physical mapping of flowering time loci in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 126, 119-132.
105. Rataj K., Simpson G.G. (2014). Message ends: RNA 3' processing and flowering time control. *J. Exp. Bot.*, 65, 353-363.
106. Rensing S.A. (2014). Gene duplication as a driver of plant morphogenetic evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 17, 43–48.
107. Risk J.M., Laurie R.E., Macknight R.C., Day C.L. (2010). FRIGIDA and related proteins have a conserved central domain and family specific N- and C-terminal regions that are functionally important. *Plant Mol. Biol.* 73, 493-505.
108. Röbbelen G. (1960) Beiträge zur Analyse de *Brassica*-Genomes. *Chromosoma*, 11, 205–228.
109. Salehi H., Ransom, C. B., Oraby, H. F. et al. (2005). Delay in flowering and increase in biomass of transgenic tobacco expressing the Arabidopsis floral repressor gene *FLOWERING LOCUS C*. *J. Plant Physiol.*, 162, 711-717.
110. Samach A., Wigge P.A. (2005). Ambient temperature perception in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 483-486.
111. Schranz M.E., Lysak M.A., Mitchell-Olds T. (2006). The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends Plant. Sci.*, 11, 535-542.
112. Schranz M.E., Song B.H., Windsor A.J., Mitchell-Olds T. (2007). Comparative genomics in the Brassicaceae: a family-wide perspective. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 168-175.
113. Shindo C, Aranzana MJ, Lister C et al. (2005). Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 138, 1163–1173.

114. Simpson G. (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 570–574
115. Simpson G.G., Dean C. *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? (2002). *Science*, 296, 285-289.
116. Soltis D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J. et al. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *Amer. J. Bot.*, 96, 336-348.
117. Song J., Angel A., Howard M., Dean C. (2012). Vernalization – a cold-induced epigenetic switch. *J. Cell Sci.*, 125, 3723–3731.
118. Spanudakis E., Jackson S. (2014). The role of microRNAs in the control of flowering time. *J. Exp. Bot.*, 65, 365-380.
119. Srikanth A., Schmid M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68, 2013-2037.
120. Stinchcombe J.R., Weinig C., Ungerer M. et al. (2004). A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA*. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 101, 4712–4717.
121. Stinchcombe J.R., Caicedo A.L., Hopkins R. et al. (2005). Vernalization sensitivity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): the effects of latitude and *FLC* variation. *Am. J. Bot.*, 92, 1701–1707.
122. Strange A., Li P., Lister C. et al. (2011). Major-effect alleles at relatively few loci underlie distinct vernalization and flowering variation in *Arabidopsis* accessions. *PLoS ONE*, 6, e19949.
123. Swiezewski S., Liu F. Q., Magusin A., Dean C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* polycomb target. *Nature*, 462, 799–802
124. Tamaki S., Matsuo S., Wong, H. L. et al. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 316, 1033-1036.
125. Tamura K, Peterson D, Peterson N et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731–2739.
126. Tang H., Woodhouse M.R., Cheng F. et al. (2012). Altered patterns of fractionation and exon deletions in *Brassica rapa* support a two-step model of paleohexaploidy. *Genetics*, 190, 1563-1574.
127. Toomajian C., Hu T.T., Aranzana M. J. et al. (2006). A nonparametric test reveals selection for rapid flowering in the *Arabidopsis* genome. *PLoS Biol.*, 2006, 4, e137.
128. Truco M. J., Hu J., Sadowski J., Quiros C. F. (1996). Inter-and intra-genomic homology of the *Brassica* genomes: implications for their origin and evolution. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 1225-1233.
129. Turck F., Fornara F., Coupland G. (2008). Regulation and identity of florigen: Flowering Locus T moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 573-594.
130. Turner A., Beales J., Faure S. et al. (2005). The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*, 310, 1031–1034.
131. Valverde F., Mouradov A., Soppe W. et al. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, 303, 1003-1006.
132. Wang Y., Deng D. (2013). Molecular basis and evolutionary pattern of GA GID1–DELLA regulatory module. *Mol. Genet. Genom.*, 1-9.
133. Wang K.C., Chang H.Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell*, 43, 904–914.
134. Wang N., Qian W., Suppanz I. et al. (2011). Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the *FRIGIDA* homologue *BnaA.FRI.a*. *J. Exp. Bot.* 62, 5641-5658.
135. Warwick S.I., Sauder C.A. (2005). Phylogeny of tribe Brassiceae (Brassicaceae) based on chloroplast restriction site polymorphisms and

- nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL* intron sequences. *Can. J. Bot.*, 83, 467-483.
136. Weigel D. (2012). Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiol.*, 158, 2-22.
137. Wollmann H, Mica E, Todesco M et al. (2011) On reconciling the interactions between *APETALA2*, *miR172* and *AGAMOUS* with the ABC model of flower development. *Development*, 137, 3633–3642
138. Xue W.Y., Xing Y., Weng X et al. (2008). Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat. Genet.*, 40, 761–767.
139. Yamaguchi A, Abe M. 2012. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *J. Plant Res.*, 125, 693–704.
140. Yamaguchi A., Wu M.F., Yang L. et al. (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev Cell*, 17, 268–278
141. Yant L., Mathieu J., Dinh T. et al. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell*, 22, 2156–2170.
142. Yogeewaran K., Frary A., York T.L. et al. (2005). Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp.: inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Res.*, 15, 505-515.
143. Żmieńko A., Samelak A., Kozłowski P., Figlerowicz M. (2014). Copy number polymorphism in plant genomes. *Theor. Appl. Genet.*, 127, 1-18.
144. Zou X., Suppanz I., Raman H. et al. (2012). Comparative analysis of *FLC* homologues in Brassicaceae provides insight into their role in the evolution of oilseed rape. *PloS ONE*, 7(9), e45751.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Последовательности генов *FRIGIDA.a* и *FRIGIDA.b*, охарактеризованные при выполнении диссертационной работы и зарегистрированные в Генбанке

Форма <i>Brassica</i>	Номер образца	Локус	Номер в Генбанке NCBI
<i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	GK030074	<i>BraA.FRI.a</i>	JN015481
		<i>BraA.FRI.b</i>	JN015482
<i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	CGN07209	<i>BraA.FRI.a-1</i>	JN882592
		<i>BraA.FRI.b-1</i>	JN882593
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	CGN11138	<i>BolC.FRI.a</i>	JN882594
		<i>BolC.FRI.b</i>	JN882595
<i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	GK97361	<i>BolC.FRI.a-1</i>	JN989363
<i>B. nigra</i> var. <i>abyssinica</i>	CGN06620	<i>BniB.FRI.a</i>	KF896288
		<i>BniB.FRI.b</i>	KJ649744
<i>B. nigra</i> var. <i>abyssinica</i>	CGN06634	<i>BniB.FRI.a</i>	KF896289
		<i>BniB.FRI.b</i>	KJ649745
<i>B. carinata</i>	CGN3978	<i>BcaC.FRI.a</i>	KF896287
		<i>BcaC.FRI.b</i>	KJ145233
		<i>BcaB.FRI.a</i>	BankIt*
		<i>BcaB.FRI.b</i>	KJ145234
<i>B. juncea</i> group Oilseed	CGN7152	<i>BjuA.FRI.a</i>	KC937068
		<i>BjuA.FRI.b</i>	KJ649746
		<i>BjuB.FRI.a</i>	BankIt*
		<i>BjuB.FRI.b</i>	KJ145235

*в процессе регистрации

JN015481 *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* cultivar Chifu 401-42 *BraA.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.a-1 allele, complete cds

ATCCCAATGGCCGTCCGTAATGGTTCTCTGCTCCCTGCTCCATCAACAAGGGAGGAGCAACCTTCA
 TCGGCGATGATCCAACGGAGAGAAGCGCAGGCTACTGTGAAACCGTGCCTACAAACATCGAAACCACGA
 TCGAACAAATCTAACGATCCTCAGTTTTTTGAAATCCATCGTTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCAGTCTGA
 CGCCTTCAAACGCCGTACGACGAACTGCAGAGCCACATGGATTACATCGGGAACGCGATCGACTCCAAT
 CTCAAAACTAACGGCATCATCGAAACCGCCGCCGCTCGCCTCCTCCGCAAACAAAACAGCCACGGCGA
 TTGCTTGCCAATCGCCGCCCAAGGAGAAGTCCGAAGCGGAGCGATTCTGCGAGTCGATGTGGAGCAAAGA
 GCTCCGAAGGTACATGTTTCGTGAACATCTCTGAGCGAGCCAAGCTAATCGAAGAGATTCCTGGAGCGTTG
 AAGCTGGCCAAGGACCCGGCGAAGTTCGTGTTGGACTGCATCGGGAAGTTTTACTTGAAGGGCGCAAAG
 CCTTCGCCAAAGATTTGCCCGCGATCACCGCGAGGAAGTTTTCGCTTCTTATCCTGGAGTGTACCTTCT
 GACGTTTTGATCCTGAGGGAGAGAAGAAGAAGCTTTTGGTTAGTTCTGTGAAAGATGAGGCGGAGGCG
 GCTGCTGTTGCGTGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTATGGACGCAA
 GGGTTTTGCTTCTGTTGGTTGCTTGTTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGGATTT
 GATTAGGCAGAGTGGTACTGATGAGATTGTTGGTGTCTTAAACGGTCACCGTTTTCTTGTCCCTATGATG
 TCAGGTACCTTGTCTTTTTCTTGAGTACGTTACAAAGGTGGTTTTCTTTTGTGTGGAATGGGTTAGAGTC
 AAGTTTTTCATCTTTGTGTTTGGTTGTTTATATGATTTTTGGGAGTAGAATTTTACGTACCATGCAATGAGA
 TAGGACAGAACATGGCATTCTAGAATGCAATGACAAGTTGTAAAGCTGCACATTCGATATTGCAAGTTCA
 AATCATTGACTTTTTATGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTAAAAGGATCTTAATACAA
 TAATCTTTTGGCCGTATAGGTATAGTTGATTCAGTATCAAGCGTGGAAATGCATATTGAAGCTCTTGAGC
 TGGTTTTATACCTTTGGGATGGAGGATAGGTTTTACCTTCTTCAATTCTAACTTCCTTCCTAAGGATGAG
 GAAGGATTCATTTGAGAGGGCGAAACGTCAAGCACAAGCACCCATGGCATCTGTATGACTCTTCTTTACT
 CGTTGTTTTACCTTGATAAACTCTTTTTTTCCTGTTCTGATTCTTATCGTTGTTTGCTTTTTTATTTTCTCA
 ACAGAAAACGCGAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTGGAAGCTCACAAAG
 TTAGACCCAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGGCCAAGCTTGAGAAAGACATTG
 TTCAGCTCGACAAACAGATGGAGGAAGCGAGATCTATCAGTCGAATGGAGGAAGCGAGATCCATCAGTCG
 AATGGAGGAAGCGAGATCCATCAGCATAAAGGAGGAAGCGGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAGCAG
 ATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGAAATGGAAATGCCACCAACAGCTGCCGCATCTTATTCTCCGATGTACC
 GCGACCACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGAGGGAGATGCAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTA
 CCTCGGCCCATCATCAGGTTTTCTCATCGGTCAGGTTTATGAGATCCCCTGAATATATGGTTCCACCT
 GGTGGGTTAGGAAGAAGTGTGTATGCGTATGATCATCTGCCTCCAAATCTTATTCTCCGGTTCACGGAC
 AGAGACGTCCTCAAGAGTACCCTCCTCCAGTTCATGGGCAACATCAAATGCCATATCGTCTATACAGACA
 TTCACCATCTGTAGAAAGACACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGACCCCTCGTAACTTATCGCAAGACCGC
 ATTGGAGGAATGTAGAATATGTAACATTCAGTTTTTTGTTTTTCAAAGAAACCACAAAATTTATTGTTTTT
 GTTTTTCAAAGAAACCACAAAATTTATTTAAAGCTTAGGGCTTAACAAGCAGAAAGCTT

JN015482 *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* *BraA.FRI.b* FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.b-1 allele, complete cds

CCCATGGCCTTTCGTAATGGTTCTCTGATCCCTGCCCATGATCCATCCACGAGGGAAAATCAATCATCAT
 CGCCGACCATAACAACGGGGAACCGTGCCTACAAACACGGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCTCA
 ATTTTTGAAATCGATCGACGATTTAACTGCGTTTTTTCAGCTGCAGTGGACGCCTTCAAACGCCACTACGAC
 GACTTGCAAAGCCACATGGATTACATCAAGAACGCCATTGACTCCAGTCTCAAGAGCAAAGGCATCACCG
 CCGAGTCTCCCTCCTCCCGATCGCAGTCTCCACGAAACGATGCTTCCGGAGAAACGGTTGCTGCCACACA
 ATCGCCGCCAAAGGAGACTTGTGAGACAGTAGCGGAGAAGGTGGAGCGATTGTGCGAGTTGATGTGCAGC
 AAAGGCCTGCGTAGATACATGTACTCGAATATCTCTGACCGAGCTAAGCTGATTGAAGAGCTTCTGCGAG

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

CTCTGAAGCTAGCCAAGGAGCCTGCTAACTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAAGTTTTACTTACAAGGGCG
CAAAGCTTATGCGAGTGATGCCATATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTCGCTTCTGATCCTGGAGTCTTAT
CTTCTAATGCTTGATCCGAAGAAGCCCTTTGATAGAGTTTCTATCAAGGATCAAGCCGAGGCGGCTGCTG
TTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAGCGAAGGAAGGTTAGCTGCGGCAGAGGCAATGGACGCTAGGGGTTT
GCTTCTGCTAATTGCTTGTTTTGGGATTCCCTCCAGCTTTTCGAGTATGGATTTGTTTGATCTGGTACGG
AAGAGTGGTGCTGCTGAGATTGCTGCTGCTCTTAAACGGTCACCTTTCCTTGTCCCTATGATGTCAGGTA
TCATCTTTTTTCTTGAGTCGATGAGTGGAGTTTCTTTTGTGGCAGAATGGGTTCAGGATTCAGTCCCATC
TTATTTTTTCTTCCCTTATAAGAGCTTAAAGATATTTTAGAGTGCAATTGCCTTGGAAAGTAGATCATATG
ACTCTTCTGTTGCATTGAGTAATGTTTCGATGAAAGGGTTTAGTAACCTGGTCCTAACACAATATTCTATTG
GTTGTAGGTATAGTTGATTCAAGTATCAAGCGTGGAAAGCATATTGAAGCTCTTGGTATGATTTATACCT
TTGGGATAGAGGATAGGTTTTCGGCTTCTTCGCTTCTAACTTCATTCCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATT
TGAGAGGGCAAAACAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTTGCATGTCCCTTCTTTACACATTAGCTACCT
CTTCACTGACTCTTTTTTTTCTTCTGATTTCGTACCATTTGTTTGCCTTTTGTCTCTTAAACAGAAAGAG
GCCAACCAAAAAGTTTTTAGCTGCGTTGTTATCAGTGATGAAGTGTGGAGGCTCACAACTTAGACCCAG
AGAGAGAAGTCAAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATTATTCAACTCGA
CAAACAGATGGAAGGGGAAGCAAGATCCATCAGTTTAAATGGAGGAAGTGGCATTGACGAAGAGATTCTAT
AACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCCTCATCTTATTCTT
CTACCTACCCGGACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACAATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCT
CGGCCCATCATCAGGTTTTTCTCATCGTTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATATTTAGCTCCATCTAGT
GGGTTAGGAAGAAGTGTACCTGCATATGAACATCTGCCTCCAAATTTCTTACCTTCCCCTTCCAGGACGGC
ACTCTCCGGTTCAAGGACAGAGACTTCCCTGGAGAGTACACCCCTCCAATTCATGGGCAACAACAAATACC
ATATGGTCTACAAAGGGTTTACAGACATTCACCATCTGTAGAAAGATACTTGGCTTTGCCCAAAATCAGG
TCTCCTCGTAACTCATAAGAAGACCACATAAGAGGAATGTAAAATATGTAACAAAG

JN882592 *Brassica rapa* subsp. *chinensis* cultivar Pakchoi *BraA.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.a-2 allele, complete cds

ATCCCCAATGGCCGTCGTAATGGTTCTCTGCTCCCTGCTCCATCAACAAGGGAGGAGCAACCTTCA
TCGGCGATGATCCAACGGAGAGAAGCGCAGGCTACTGTGAAACCGTGCCTACAAACATCGAAACCACGA
TCGAACAATCTAACGATCCTCAGTTTTTGGARATCCATCGTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCAGTCGA
CGCCTTCAAACGCCGCTACGACGAACTGCAGAGCCACATGGATTACATCGGGAACGCGATCGACTCCAAT
CTCAAACTAACGGCATCATCGAAACCGCCGCGCGTGCCTCCTCCGCAAAACAAAACAGCCACGGCGA
TTGCTTGCCAAATCGCCGCCCAAGGAGAAGTCCGAAGCGGAGCGATTCTGCGAGTCGATGTGGAGCAAAGA
GCTTCGAAGGTACATGTTTCGTGAACATCTCTGAGCGAGCCAAGCTAATCGAAGAGATTCCCTGGAGCGTTG
AAGCTTGCCAAAGGACCCGGCGAAGTTTCGTGTTGGACTGCATCGGGAAGTTTTACTTGAAGGGCGCAAAG
CCTTCGCCAACGATTTGCCCGCGATCACCGCGAGGAAGGTTTCGCTTCTTATCCTGGAGTGTACCTTCT
GACGTTTGATCCTGAGGGAGAGGGAGAGAAGAAGAAGCTTTTGGTTAGTTCTGTGAAAGATGAGGCGGAG
GCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTATGGACG
CCAGGGGTTTGTCTGTTGGTTGCTTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGGA
TTTGATTAGGCAGAGTGGTACTGCTGAGATTGTTGGTGTCTTAAACGGTCACCGTTTCTTGTCCCTATC
ATGTCAGGTACCTTGTCTTTTCTTGTAGTACGTTACAAAGGTGGTTTTCTTTTGTGTGGAATGGGTTAGA
ATCAAGTTTTTCTCTTTGTTTTTGGTTGTTTATATGATTTTGGGAGTAGAATTTTACGTACCATGCAATG
AGATAGGACAGAACATGGCATTCTAGAATGCAATGACAAGTTGTAAAGCTGCACATTCGATATTGCAAGT
TCAAATCATTTGACTTTTTATGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTAAAAGGATCTTAATA
CAATAATCTTTTGGCCGTATAGGTATAGTTGATTCAAGTATCAAGCGTGAATGCATATTGAAGCTCTTG
AGCTGGTTTTATACCTTTGGGATGGAGGATAGGTTTTTACCTTCTTCAATTCCTTCCCTAAGGAT
GAGGAAGGATTCATTTGAGAGGGCGAAACGTCAAGCACAAAGCACCCATGGCATCTGTATGACTCTTCTTT
ACTCGTTTTTTTACCTTGATAAACTCTTTTTTCTGTTCTGATTCTTATCGTTGTTTGCCTTTTTTATTTT

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

TCAACAGAAAAGCTGCGAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTTTGGAAAGCTCAC
AAGTTAGACCCAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGGCCAAGCTTGAGAAAGACA
TTGTTTCAGCTCGACAAACAGATGGAGGAAGCGAGATCTATCAGTCGAATGGAGGAAGCGAGATCCATCAG
TCGAATGGAGGAAGCGAGATCCATCAGCATAAGGGAGGAAGCGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAG
CAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGAAATGGAAATGCCACCAACAGCTGCCGCATCTTATTCTCCGATGT
ACCGCGACCACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGAGGGAGATGCAGATGAAATATCAGCTCTTGTCTAGTAG
TTACCTCGGCCCATCATCAGGTTTTCTCATCGGTCAGGTTTATGAGATCCCCTGAATATATGGTTCCA
CCTGGTGGGTAGGAAGAAGTGTGTATGCGTATGATCATCTGCCTCCAAATCTTATTCTCCGGTTCACG
GACAGAGACGTCCTCAAGAGTACCCTCCTCCAGTTCATGGGCAACATCAAATGCCATATCGTCTATACAG
ACATTCACCATCTGTAGAAAGACACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGACCCCTCGTAACTTATCGCAAGAC
CGCATTGGAGGAATGTAGAAATATGTAACATTCAGTTTTTGTTTTTTCAAAGAAACCACAAAATTTATTGTT
TTTGTTTTTTCAAAGAAACCACAAAATTTATTTAAAGCTTAGGGCTTAACAAGCAGAAAGCTT

JN882593 *Brassica rapa* subsp. *chinensis* BraA.FRI.b FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.b-2 allele, complete cds

ATGGCCTTTTCGTAATGGTTCTCTGATCCCTCCCCATGATCCATCATCGCCGACCATAACAACGGGGAAACCG
TGCCTACAAACACTGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCTCAATTTTTGAAATCGATCGACGATTT
AACTGCGTTTTTCAGCTGCAGTGGACGCCTTCAAACGCCACTACGACGACTTGCAAAGCCACATGGATTAC
ATCAAGAACGCCATTGACTCCAGTCTCAAGAGCAAAGGCATCACCGCCGAGTCTCCCTCCTCCCGATCGC
AGTCTCCACGAAACGATGCTTCCGGAGAAACGGTTGCTGCCACACAATCGCCGCCAAAGGAGACTTGTGA
GACAGTAGCGGAGAAGGTGGAGCGATTGTGCGAGTTGATGTGCAGCAAAGGCCTGCGTAGATACATGTAC
TCGAATATCTCTGACCGAGCTAAGCTGATTGAAGAGCTTCTGCAGCTCTGAAGCTAGCCAAGGAGCCTG
CTAACTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAAGTTTTACTTACAAGGGCGCAAAGCTTATGCGAGTGATTCCCA
TATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTTCGCTTCTGATCCTGGAGTCTTATCTTCTAATGCTTGATCCGAAGAAG
CCTTTTGATAGAGTTTTCTATCAAGGATCAAGCCGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGA
GCGAAGGAAGGTTAGCTGCGGCAGAGGCAATGGACGCTAGGGGTTTTGCTTCTGCTAATTGCTTGTTTTTGG
GATTCCTTCCAGCTTTTTCGAGTATGGATTTGTTTTGATCTGGTACGGAAGAGTGGTGCTGCTGAGATTGCT
GCTGCTCTAAAACGGTACCTTTCTTGTCCCTATGATGTCAGGTATCATCTTTTTTCTTGAGTCGATGA
GTGGAGTTTTCTTTTGTGGTCAGGATTCAGTTCCCATCTTTATTTTTGCTTCCCTTATAAGAGCTTAAGAGT
ATTTTAGAGTGCAATTGCCTTGGAAAGTAGATCATATGACTCTTCTGTTGCATTGAGTAATGTTTCGATGAA
AGGGTTTAGTAACGGTCCTAACACAATATCTATCGGTTGTAGGTATAGTTGATTCAGTATCAAGCGT
GGAAAGCATATTGAAGCTCTTGGTATGATTTATAACCTTTGGGATAGAGGATAGGTTTTCGGCTTCTTCGC
TTCTAACTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAACAGAAAGCTCAAGCACCGAT
AGCATTTCATGTCCCTTCTTTACACATTAGCTACCTCTTCACTGACTCTTTTTTTCTCTTCTGATTCG
TACCATTGTTTGCCTTTTGTCTCTTAACAGAAAGAGGCCAACCAAAAGTTTTTAGCTGCGTTGTTATCA
GTGATGAAGTGTTTGGAGGCTCACAACCTTAGACCCAGAGAGAGAAGTTCAAGGGTGGCAGATCAAAGAGC
AAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATTATTCAACTCGACAAACAGATGGAAGGGGAAGCAAGATCCATCAG
TTTAATGGAGGAAGTGGCATTGACGAAGAGATTCTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGAC
ATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCCTCATCTTATTCTTCTACCTACCCGGACCGAAGCTTCCCTAGTCACA
GAGACAATGAAATATCAGCTCTTGTCTAGTAGTTACCTCGGCCATCATCAGGTTTTCTCATCGTTCAAG
TCTCAGGAGATCCCCTGAATATTTAGCTCCATCTAGTGGGTTAGGAAGAAGTGTACCTGCATATGAACAT
CTGCCTCCAAATCTTACCTTCCCTTCCAGGACGGCACTCTCCGGTTCAGGACAGAGACTTCCCTGGAG
AGTACACCCCTCCAATTCATGGGCAACAACAATAACCATATGGTCTACAAAGGGTTTACAGACATTCACC
ATCTGTAGAAAAGATACTTGGCTTTGCCAAAATCAGGTCTCCTCGTAACTCATAAGAAGACCACATAAGA
GGAATGTAA

**JN882594 *Brassica oleracea* var. *acephala* cultivar Frosty BolC.FRI.a
FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.a-1 allele, complete cds**

ATTCCCATGGCCTTCCGTAACGGCTACGCACATCGTCCATCAACAAGGGAGGAGGAGCAACCTTCATCGG
CGATGATCCGACGGAGAGAAGCGCAGGCTTCTGTGAAACCACGATCGAACAATCTAACGACCCTCAGTT
TTTGAAATCCATCGTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCGGTGAACGCCCTCAAACGCCGCTACGACGAA
CTGCAGAGCCACATGGATTACATCGAGAACGCGATCGACTCCAATCTCAAAACTAACGGCATTATCGAAA
TCGCCGCCGCGTCGCCGCCTTCGCCGAACAAAACAGCCACGGCGATTGCGTACCAATCGCCGCCCAAAGA
GAAGTCCGAAGCGGAGCGATTGTGCGAGTCGATGTGCGAGCAAAGAGCTCCGCAGGTACATGTTTCGTGAAC
ATATCTGAGAGAGCCAAGCTAATCGAAGAGCTTCCCTGGAGCGTTGAAGCTTGCCAAGGACCCCGCGAAGT
TCGTGTTGGATTGCATTGGGAAGTTTACTTGCAAGGGCGCAAGGCGTTCGCCAACGACTCGCCCCGCGAT
CACC GCGAGGAAGGTTTCGCTTCTTGTCTGGAGTGTTATCTTCTGACGTTTGATCCTGAGGGAGAGAAG
AAGCAGGTTGGTAGTTCTGTGAAAGATGAGGCGGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGG
GTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTGTGGATGCAAGGGGTTTCTTCTGTTGGTTGCTTGTTTTG
GATTCCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGGATTTGATTAGGCAGAGTGGTACTGCTGAGATTGTT
GGTGCTCTTAAACGGTCTCCGTTTCTTGTCCCTATGATGTCAGGTACCTTGTCTTTCTTGAGTTGATGG
ATTTACATTACAAAGGCTGTTTCTTTAGAATCAATGTTTCATCTTTGTTTTGGGTTGTGTATAATGAGCT
TGTGAGTAGAGTAGAATTACATGTACAAAATAGGAGACAACATTCTAGAGTTGAGTGAGACATTATAAAG
CTGCACATTACGAAATCTTATTTGTTATAATTAAGCCAGGTCTTATATCCTTGAAAGTGTGGTTTTCA
ATATTGCAAGTTAGAATCATCAATCATGTGACTTTGCTGTTGACTAAAAGGCTTAAACAATATTCTATT
GGCCATAGGTATAGTTGATTCAAGTATCAAGCGTGGAATGCATATTGAAGCACTTGAGATGGTTTTATACC
TTTGGGATGGAGGATAGGTTTTACCTTCTTCAATTCTAACTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCAT
TTGAGAGGGCGAAACGTAAAGCACAAGCACCCATGGCATCTGTATGACTCTTCTTTACTCGTTATTTACC
TTAATAAACTTTTTTTTCTGTTCTGATTCTTATCGTTGTTTGCTTTTTATTTTCTCAACAGAAAACG
CAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTGGGAGCTCACAAGTTAGACCCAGCG
AAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCCAAGAGCAAATGGCGAAGCTTGAGAAAGAGATTGTTTCAGCTCGACA
AACAGATGGAGGAAGCGAGATCCATCAGTCGAATGGAGGAAGCCAGATCCATCAGTCGAATGGAGGAAGC
GGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGAAAAGGAAATGCCACCA
ACAGCTTCCTTATCTTATTCTCCTATGTACCGCGACCAAAGCTTCCCTAGTCACAGAGAGGGAGATGCAG
ATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCTCGGCCATCAGCAGGTTTTCTCTTCGGTCAAGTCTCAG
GAGATCCCCTGAATATATGGTTCCACCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGATCTGCGTATGATCATCAGCCT
CCAATTCTTATTCTCCGGTTTCAAGAAGTACTCTCCAGTTCACGGACAGAGACTTCTCAAGAGTACT
CTCTTCCGGTTCATGGTCTATACAGACATTCACCATCTGTTGAAAGATACTTGGCTTTGTCCAATCACAG
GACTCCTCGTAACTTATCACAAGACCGCATAGGAGGAATGTAGAATATGTAACCTTAAAGTTTTTGTTTG
TTTTTCAAAGAAACCACAGAATTTATTTAATAAACACAAAGCTTAGGATC

**JN882595 *Brassica oleracea* var. *acephala* cultivar Frosty BolC.FRI.b
FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.b-1 allele, complete cds**

CCCATGGCCTTCCGTAATGGTTCTCTGATCCCTGCCCGTGATCCATCGACGAGGGAGAATCAACCATCAT
TGCCGACCATAACAACGGGGAACCGTGCCTACAAACACGGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCTCA
ATTTTTGAAATCGATCGACGATTTAACTGCGTTTTGCAGCTGCGATGGACGCCTTCAAACGCCACTACGAC
GACTTGCAAAAACCATGGATTACATCAAGAATGCCATTGGCTCCAGTCTCAAATTCAAAGGCATCATCG
CCGAGTCTCCCTCCTCCCGATCGCAGTCTCCACGGAACGATGCTTCCGGAGAAACAGCCACCGCGGTTGC
CGCCACACAATCGCCGCCAAAGGAGACTTCTGAGACAGTACCGGAGATTTCCGGATAAGGTGGAGCGATTG
TGCGAGTTGATGTGCGAGCAAAGGCCTGCGTAGATACATGTAAGTCTGTAAGTCTGTAAGTCTGTAAGTCTG
TTGAAGAGCTTCCCTGCAGCTCTGAAGCTAGCCAAGGAGCCAGCTAAGTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAA

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

GTTTTTCTTACAAGGGCGCAAAGCTTATGCGAGTGATTCCCATATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTCGCTT
CTTATTCTCGAGTGTTATCTTCTAATGCTTGATCCTAGCGAAGAGAAGAAGCCCATTGATGGTTCTATCA
AGGATGAAGCCGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAACGAAGGTAGGTTAGCTGCGGC
AGAGGCAATGGACGCAAGGGTTTGCTTCTGCTAATTGCTTGTTTTGGGATTCCTTCGAGCTTTAAGAGT
ATGGATTTGTTGATCTGGTACGGAAGAGTGGTACTGCTGAGATTGCTGCTGCTCTAAAACGGTCACCTT
TCCTTGTCCTTATGATGTCAGGTATCATCTTCTTTCTTGAGTCGATGAGTTTTCCATTACAAAGGTGGTTT
CTTTTGTTGCAGAATGGGTGAGGATTAAGTTCCCATCTTTATTTTTTGTTCCTTATAAGATCTTAAGAGT
AGAATCATCTGCAGTTAACAATGAAAGAAAATGGCATTTTAGAGCGCAATTGCCTTGGAAGTAGATCATA
TGACTGTTCTGTTGCATGCTAATTAATCATTTAGTAATGTTTCGATGAAAGGGTTTAGTAAGTGGTCTTAA
CACATTATTCTATCGGTGCTAGGTATAGTTGATTTAAGTATCAAGCGTGGAATGCATATTGAAGCACTTG
GGATGATTTATACCTTTGGGATAGAGGATAGGTTTTCGGCTTCTTCGCTTCTAACTTCATTCCSTAAGGAT
GAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAAACAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTGTATGGCCCTCTTA
GCTACCCTCATGACTCTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCTGATTCTTACCATTGTTTGCCTTTTGTTCTCTT
AACAGAAAGAGGCCAACAAAAAGTTTTTAGCTGCCTTGTTATCAGTCATGAAGTGTTTGGAGGCTCACAA
CTTAGACCCAGAGAAAGAAGTACAAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATT
CTTCAACTCGACAAACAGATGCAAGGGGAAGCAAGATCCATCAGTTTAATGGAGGAAACAGCATTGACGA
AGAGATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCTC
ATCTTATTCTTCTACCTACCCTGCCCCAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACGATGAAATATCAGCTCTTGTC
AGTAGTTACCTCGAGCCTTACCAGGTTTTCTCATCGGTCAAGTCTCAGGAGTCCCCTGAATATTTAG
CTCCACCTAGTGGTTTAGGAAGAAGTGTACCTGCATATGAGCATCTGCCTCCAACTTCTTACCTTCCCCT
TCCAAGATGGCACTCTCCGGTTCACGGACAGAGACTTCCCTGGAGAGTACTCTCCTCCTATTCATGGGCAA
GAACAAATATCATATGGTCGTCTACAAAGGGTTTACAGACATTCACCATCTGTAGAAAGATACTTGGGTT
TGCCCAATCACAGGTCTCCTCGTAACTCATAAAAACACCACATCGGAGGAATGTAATATTGTAACAAAG
G

JN989363 *Brassica oleracea* var. *alboblabra* cultivar A12DH *BolC.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI-a-2 allele, complete cds

ATCCCCAATGGCCGTCCGTAACGGCTACGCACATCGTCCATCAACAAGGGAGGAGGAGCAACCTTCATCG
GCGATGATCCGACGGAGAGAAGCGCAGGCTACTGTGCGAAACCGTGCTACAAACATCGAAACCACGATCG
AACAATCTAACGACCCTCAGTTTTTTGAAATCCATCGTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCAGTGAACGC
CTTCAAACGCCGCTACGACGAACTGCAGAGCCACATGGATTACATCGAGAACGCGATCGACTCCAATCTC
AAAATAACGGCATCGTCGAAATCGCCGCGTGTGCGCTCCGCCGAAGGATGCCTCTGGAGAAACAGCCA
CGGCGATTGCGTGCCAATCGCCGCCAAACAGAAGTCCGAAGCGGAGCGATTGTGCGAGTGCATGTGTAG
CAAAGAGCTCCGCAGGTACATGTTTCGTGAACATATCTGAGAGAGCCAAGCTAATCGAAGAGCTTCCTGGA
GCGTTGAAGCTTGCCAAGGACCCGGCGAAGTTCGTGTTGGATTGCATTGGGAAGTTTTACTTGCAAGGGC
GCAAGGCGTTGCGCAACGACTCGCCCGGATCACC GCGAGGAAGGTTTCGCTTCTTGTCTGGAGTGTTA
TCTTCTGACGTTTGATCCTGAAGGAGAGAAGAAGCAGGTTGGTAGTTCTGTGAAAGATGAGGCGGAGGCG
GCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTGTGGATGCAA
GGGTTTTGCTTCTGTTGGTTGCTTGTTTTTGGGATTCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGAATTT
GATTAGGCAGAGTGGTACTGCTGAGATTGTTGGTGCTCTTAAACGGTCTCCGTTTTCTTGTCCCTATGATG
TCAGGTACCTTGTCTTTCTTGAGTTGATGAATTTACATTACAAAGGCTGTTTCTTTAGAATCAAAAATGT
TTCATCTTTGTTTTGGGTTGTGTATAATGAGCTTGTGAGTAGAGTAGAATTACATGTACAAAATAGGAGA
CAACATTCTAGAGTTGAGTGAGACATTATAGAGCTGCACATTCACGAAATTGTTATTTGTTAGAACCAAG
CAAGGTCTTATTGCCTTGAAAGTAGTGGTTTTTCGATATTGCAAGTTAGAATCATGTGACTAAGCTGTTGA
CTAAAAGGGTCTAACAAATATTCTATTGGCCATAGGTATAGTTGATTCAAGTATCAAGCGTGGAATGCAT
ATTGAAGCACTTGAGATGGTTTATACCTTTGGGATGGAGGATAGGTTTTCACCTTCTTCAATTCTAACTT
CATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCGAAACGTAAAGCACAAGCACCCATGGCATCTGT

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

ATGACTCTTCTTTACTCGTTTTAACTTTTTTTTTCTGTCTGATTCTTATCGTTGTTTGCTTTTTATTTT
CTCAACAGAAAACCTGCGAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTGGGAAAGCTCA
CAAGTTAGACCCAGTGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCCAAGAGCAAATGGCGAAGCTTGAGAAAAGAG
ATTGTTTCAGCTCGACAAACAGATGGAAGAAGCGAGATCCATCAGTCGAATGGAGGAAGCGCGATCCATCA
GTCTAAGGGAGGAAGCGGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGA
AAGGGAAATGCCACCAACAGCTTCCTTATCTTATTCTCCTATGTACCGCGACCAAAGCTTCCCTAGTCAC
AGAGAGGGAGATGCAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCTCGGCCCATCAGCAGGTTTTCCCTC
ATCGGTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATATATGGTTCACCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTCTCTGC
GTATGATCATCAGCCTCCAAATCTTATTCTCCGTTTTCAAGAAGGTACTCTCCAGTTCACGGACAGAGA
CTTCCCTCAAGAGTACTCTCTTCCAGTTCATGGGCAACACCAAATGCCATATGGTCTATACAGACATTCAC
CATCTGTTGAAAGATACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGACTCCTCGTAACTTATCACAAGACCGCATAGG
AGGAATGTAGAATATGTAACTTTAAGTTTTTGTGTTTTGTTTTCAAGAAACCACAGAAATTTATTTAATAAA
CACAAAGCTTAGGATC

KF896288 *Brassica nigra* var. *abyssinica* cultivar Giebra *BniB.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI.a) gene, FRI.a-1 allele, partial cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGAGGGTTAGCTGCAGCAGAGGCTATGGACGCC
AGGGGTTTGCTTCTGCTTGTGCTTGTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAATATGGATCTGTTGGATT
TGATTAGGAAGAGTGGGACTGCTGAGATTGATGGTGTCTGAAACGGTCGCCTTTTTCTTGTCCSTATGAT
GTCAGGTACCTTGTCTTTTTCTTGAGTTGATGAATTTACGTTATAAAATTTGGGAGTAGTGTTTTTTTGATA
TTGCAAGTTAAAATCATGGGACTTTGCTGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTCAAGGTG
GTTTCTTTTCGATGAAGAATGGGTTGGAATCAAGGTTTCATCTTTGTTTTTAGTTTGGCATATGAGCTTGT
GAATTGGATTCTATGTACCCTGCAATGAATACTACATAATCCTTGAGCAATGGCTCTGCTGTTGCTTACT
TGATAAGCCTTGAGCAGTGTGACTAAAAGGTTTTCTATCGGAACGTAGGTATAGTGGATTCAAGTATCA
AGCGTGGACTGCATATCGAAGCTCTTGAGATGGTTTTATACCTTTGGGATGGAGGAGAGGTTTTTCACCTTC
TTCAATTCTAAGTTCATTCTAAGGATGAGCAAGGAATCATTGAGAGAGCGAAACGTAAAGCACAAGCA
CCCAAGGCATTTGTATGACAAACTCTTCTTTGCCTTTTTTTTTTTTTCTTTTTCTGATTGCTTACCGTTA
TTTGCTTTTTCATTTCTCTCAACAGARAGAGGCGAACGAAAAGCAGTTAGATGCGTTGTTATCAGTGATGA
AGTGCTTGGAGGCTCACAAGTTAGACCCAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGRGCAGATGGT
GAAGCTTGAGAAAGACATTGCTCAGCTCGACAAGAAGATGGAGGAGGAAGCGAGAGCCATCAGCCTAATG
GAGGAGGAAGCGGCACTTAACAAGAGAGTGTATACCCAACAGGTGAAACGYCCAAGGTTGTCAGACATGG
AAATTCACCACCAATAGTTTCTCATCTTATTCTCCTATATACCGTGACCACCGAAGCTTCTCTAGCCA
CAGAGACGGAGAAACAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGCTACCTCGGCTCATCATCAGGTTTTCCCT
CACCGGTCAAGTCTCGGGAGATCCCCTGAGTACATGGTCCATCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTGTATG
CGTATGATCATCTACCTCCAAATCTTACTCTCCGGTTCCAAGACAGCATTCCCCGGTTTACGGACAGAG
ACTTCATCAAGAGTACTCTCCTCCAGTACACCAAATGCCATATGGTCTGCAAAGAGTTTATAGGCATTCA
CCATCTGTAGAAAGGTAAGTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KJ649744 *Brassica nigra* var. *abyssinica* cultivar Giebra *BniB.FRI.b* FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-1 allele, partial cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAACGAAGGAAGGTTAGCTGCAGCGGAGGCGATGGACGCA
AAGGGTTTGCTTCTGCTAATTTCTTGTGTTTTGGGATTCCCTTCGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGATT
TGGTACGGAAGAGTGATACTCCTGAGATTGCTGCTGCTCTAAAACGCTCACTTTTTCTTGTCCSTATGAT
ATCAGGTATCATCTTCTTTCTAGTTTTCGATTACCAAGGTGGTTTTCTTTTTGTTGTAGAATGGGTCATGATT

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

AAGTTCCCATCTTTGTTTTTGGTTGCGTATATGAGCTTAATAAGAGTAGAATCATATGTA CTCTGCAATA
AACTATGACACAAAATGACTCTTCTGTTGCAAACCTTAAAGCATTGAATTATGTTTCGATTAAGGTTCTAT
CGGTTCGTAGGTATTGTTGATTATAGTATCAAGCGTGGAAAGCATATTGAAGCGCTTGAGATGGTTTCATAC
CTTTGGGATTGAGGATAGGTTTTTCAGCTTCTTCGATTCTAACTTCATTCCTAAGGACGAGCAAGGAGTCA
TTTGAGAGGGCAAACAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTTGTATGCCCTTCTTTACACATCAGCTAC
CTTCATTGACTCTTCTGTTTCTTACCATTGTTTGCCTTTTATTCTCTTAACAGAAAAGAGGCGAACCAAAA
GTTTTTAGCTGCGTTGTTATCAGTGATGAAGTGTGGAGGCTCACAACCTCGACCCAGAGAAAAGAAGTA
CAAGGGTGGCAGATCAAAGAGAAAATGATTAAGTTGGAGAAAAGACATTCTTCAGCTCGATAAACAGATGG
AAGGGGAAGCAAGATCCATCAGTTTAGTGAGGAAGCGGCATTGACAAAAGAGATTGTATAACCAACAGAT
GAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGTAGCTTCCTCGTCTTATTCTTCTACCTACCCT
GACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACGATGAAATATCAGCTCTTGTCAGTAGTTACCTCGGCCCATCAT
CAGTTTTTCTCATCGGTCAAGTCTCAGGAGATCCCCATAATATATAGCTCCACCTGGTGGGTTAGGAAG
AAGTGTACCTACGTATGAACATCTGCCCCAAATTCTTACTCTCCGGTTCCAAGAGGGCACACTCTAGTT
CACGGACAGAGACTTCCCTCAAGAGTACACTCCTCCAGTTCATGGGCAACAACAATAACCATATGGTCTTC
AAAGGGTTTACAGACATTCACCATCTGCAGAAAAGATACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KF896289 *Brassica nigra* var. *abyssinica* cultivar Senafich (Amharic) *BniB.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI.a) gene, FRI.a-1 allele, partial cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGAGGGTTAGCTGCAGCAGAGGCTATGGACGCC
AGGGGTTTTGCTTCTGCTTGTGCTTGTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAATATGGATCTGTTGGATT
TGATTAGGAAGAGTGGGACTGCTGAGATTGATGGTGCTCTGAAACGGTCGCCTTTTCTTGTCCCTATGAT
GTCAGGTACCTTGTCTTTTCTTGAGTTGATGAATTTACGTTATAAATTTGGGAGTAGTGTTTTTTGATA
TTGCAAGTTAAAATCATGGGACTTTGCTGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTCAAGGTG
GTTTCTTTTCGATGAAGAATGGGTTGGAATCAAGGTTTCATCTTTGTTTTTAGTTTGGCATATGAGCTTGT
GAATTGGATTCTATGTACCTGCAATGAACTACATAATCCTTGAGCAATGGCTCTGCTGTTGCTTACT
TGATAAGCCTTGAGCAGTGTGACTAAAAGGGTTTCTATCGGAACGTAGGTATAGTGGATTCAAGTATCA
AGCGTGGACTGCATATCGAAGCTCTTGAGATGGTTTATACCTTTGGGATGGAGGAGAGGTTTTTACCTTC
TTCAATTCTAAGTTCATTCCCTAAGGATGAGCAAGGAATCATTGAGAGAGCGAAAACGTAAAGCACAAAGCA
CCCAAGGCATCTGTATGACAACTCTTCTTTGCCTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTCTGATTGCTTACCGTTA
TTTGCTTTTTCATTTCTCTCAACAGAAAAGAGGCGAACGAAAAGCAGTTAGATGCGTTGTTATCAGTGATGA
AGTGCTTGGAGGCTCACAAGTTAGACCCAGCGAAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGRGCAGATGGT
GAAGCTTGAGAAAGACATTGCTCAGCTCGACAAGAAGATGGAGGAGGAAGCGAGAGCCATCAGCCTAATG
GAGGAGGAAGCGGCACTTAACAAGAGAGTGTATACCCAACAGGTGAAAACGYCCAAGGTTGTCAGACATGG
AAATTCACCACCAATAGTTTCCCTCATCTTATTCTCCTATATACCGTGACCACCGAAGCTTCTCTAGCCA
CAGAGACGGAGAAACAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGCTACCTCGGCTCATCATCAGGTTTTCTCT
CACCGGTCAAGTCTCGGGAGATCCCCTGAGTACATGGTTCCATCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTGTATG
CGTATGATCATCTACCTCCAAATCTTACTCTCCGGTTCCAAGACAGCATTCCCCGGTTTACGGACAGAG
ACTTCATCAAGAGTACTCTCCTCCAGTACACCAATGCCATATGGTCTGCAAAGAGTTTATAGGCATTCA
CCATCTGTAGAAAAGGTA CTTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KJ649745 *Brassica nigra* var. *abyssinica* cultivar Senafich (Amharic) *BniB.FRI.b* FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-1 allele, partial cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAACGAAGGAAGGTTAGCTGCAGCGGAGGCGATGGACGCA
AAGGGTTTGCTTCTGCTAATTTCTTGTGTTTGGGATTCCCTTCGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTTGATT
TGGTACGGAAGAGTGATACTCCTGAGATTGCTGCTGCTCTAAAACGCTCACTTTTCTTGTCCCTATGAT
ATCAGGTATCATCTTCTTTCTAGTTTTCGATTACCAAGGTGGTTCCTTTTGTGTAGAATGGGTCATGATT
AAGTTCCCATCTTTGTTTTTGGTTGCGTATATGAGCTTAATAAGAGTAGAATCATATGTA CTCTGCAATA
AACTATGACACAAAATGACTCTTCTGTTGCAAACCTTTAAGCATTGAATTATGTTTCGATTAAAGGTTCTAT
CGGTTCGTAGGTATTGTTGATTATAGTATCAAGCGTGGAAAGCATATTGAAGCGCTTGAGATGGTTCATAC
CTTTGGGATTGAGGATAGGTTTTCAGCTTCTTCGATTCTAACTTCATTCCTAAGGACGAGCAAGGAGTCA
TTTGAGAGGGCAAACAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTTGTATGCCCTTCTTTACACATCAGCTAC
CTTCATTGACTCTTCTGTTTCTTACCATTGTTTGCCTTTTATTCTCTTAACAGAAAGAGGGCAACCAAAA
GTTTTTAGCTGCGTTGTTATCAGTGATGAAGTGTGTTGGAGGCTCACAACCTTCGACCCAGAGAAAGAAGTA
CAAGGGTGGCAGATCAAAGAGAAAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATTCCTCAGCTCGATAAACAGATGG
AAGGGGAAGCAAGATCCATCAGTTTAGTGGAGGAAGCGGCATTGACAAAGAGATTGTATAACCAACAGAT
GAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAAATGCCACCAGTAGCTTCCTCGTCTTATTCTTCTACCTACCCT
GACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACGATGAAATATCAGCTCTTGTTCAGTAGTTACCTCGGCCCATCAT
CAGGTTTTTCTCATCGGTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTAAATATATAGCTCCACCTGGTGGGTTAGGAAG
AAGTGTACCTACGTATGAACATCTGCCCCAAATTCTTACTCTCCGGTCCAAGAGGGCACACTCTAGTT
CACGGACAGAGACTTCCTCAAGAGTACACTCCTCCAGTTCATGGGCAACAACAATAACCATATGGTCTTC
AAAGGGTTTACAGACATTCACCATCTGCAGAAAGATACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KF896287 *Brassica carinata* cultivar Gommenzer (Amharic) *BcaC.FRI.a* FRIGIDA-like protein (FRI.a) gene, FRI.a-1 allele, complete cds

ATCCCAATGGCCGTCCGTAACGGCTACGCACATCGTCCATCAACAAGGGAGGAGGAGCAACCTTCATCG
GCGATGATCCGACGGAGAGAAGCGCAGGCTACTGTGCAAACCGTGCCTACAACATCGAAACCACGATCG
ACAATCTAACGACCCTCAGTTTTTGAATCCATCGTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCAGTGAACGC
CTTCAAACGCCGCTACGACGAACTGCAGAGCCACATGGATTACATCGAGAACGCGATCGACTCCAATCTC
AAAATAACGGCATCGTCGAAATCGCCGCCGTGTCGCCCTCCGCCGAAGGATGCCTCTGGAGAAACAGCCA
CGGCGATTGCGTGCCAATCGCCGCCCAAACAGAAGTCCGAAGCGGAGCGATTGTGCGAGTTCGATGTGTAG
CAAAGAGCTCCGCAGGTACATGTTTCGTGAACATATCTGAGAGAGCCAAGCTAATCGAAGAGCTTCCTGGA
GCGTTGAAGCTTGCCAAGGACCCGGCGAAGTTCGTGTTGGATTGCATTGGGAAGTTTTACTTGAAGGGC
GCAAGGCGTTCGCCAACGACTCGCCCGGATCACC CGGAGGAAGGTTTCGCTTCTTGTCTGGAGTGTTA
TCTTCTGACGTTTGATCCTGAAGGAGAGAAGAAGCAGGTTGGTAGTTCGTGAAAGATGAGGCGGAGGCG
GCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTGTGGATGCAA
GGGTTTTGCTTCTGTTGGTTGCTTGTGTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTGAATTT
GATTAGGCAGAGTGGTACTGCTGAGATTGTTGGTGCTCTTAAACGGTCTCCGTTTCTTGTCCCTATGATG
TCAGGTACCTTGTCTTTCTTGTGAGTTGATGAATTTACATTACAAAGGCTGTCTCTTTAGAATCAAAAATGT
TTCATCTTTGTTTTTGGGTTGCGTATAATGAGCTTGTGAGTAGAGTAGAATTACATGTACAAAATAGGAGA
CAACATTCTAGAGTTGAGTGAGACATTATAGGGCTGCACATTACGAAATTGTTATTTGTTAGAACCAAG
CAAGGTCTTATTGCCTTGAAAGTAGTGGTTTTTCGATATTGCAAGTTAGAATCATGTGACTAAGCTGTTGA
CTAAAAGGGTCCTAACAATATCTATTGGCCATAGGTATAGTTGATTCAAGTACCAAGCGTGGAAATGCAT

ATTGAAGCACTTGAGATGGTTTATACCTTTGGGATGGAGGATAGGTTTTACSTTCTTCAATTCTAACTT
 CATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCGAAACGTAAAGCACAAGCACCCATGGCATCTGT
 ATGACTCTTCTTTACTCGTTTTAACTTTTTTTTTCTGTCTGATTCTTATCGTTGTTTGCTTTTTATTTT
 CTCAACAGAAAACCTGCGAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTTTGGAAGCTCA
 CAAGTTAGACCCAGTGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCCAAGAGCAAATGGCGAAGCTTGAGGAAGAG
 ATTGTTTCAGCTCGACAAACAGATGGAAGAAGCGAGATCCATCAGTCGAATGGAGGAAGCGCGATCCATCA
 GTCTAAGGGAGGAAGCGGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGA
 AAGGGAAATGCCACCAACAGCTTCCCTTATCTTATTCTCCTATGTACCGCGACCAAAGCTTCCCTAGTCAC
 AGAGAGGGGAGATGCAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCTCGGCCCATCAGCAGGTTTTCCCTC
 ATCGGTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATATATGGTTCACCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTCTCTGC
 GTATGATCATCAGCCTCCAAATCTTATTCTCCGGTTTTCAAGAAGGTACTCTCCAGTTCACGGACAGAGA
 CTCCTCAAGAGTACTCTCTTCCAGTTCATGGGCAACACCAAATGCCATATGGTCTATACAGACATTCAC
 CATCTGTTGAAAGATACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGACTCCTCGTAACTTATCACAAGACCCGCATAGG
 AGGAATGTAGAATATGTAACTTTAAGTTTTTGTTTTTGTTTTCAAAGAAACCACAGAATTTATTTAATAA
 ACACAAAGCTTAGGATC

KJ145233 *Brassica carinata* BcaC.FRI.b FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-1 allele, complete cds

ATGGCCTTCCGTAATGATTCTCTGATCCCTGCCCGTGATCCATCCACGAGGGAGAATAAACCATCATCGC
 CGACCATAACAACGGGAACCGTGCCACAAACACGGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCGCAATT
 TTTGAAATCGATCGACGATTTAACTGCGTTTGCAGCTGCGATGGACGCCTTCAAACGCCACTACGACGAC
 TTGCAAACCCACATGGATTACATCAAGAACGCCATTGGCTCCAGTCTCAAATTCAAAGGCATCATCGCCG
 AGTCTCCCTCCTCCCGATCGCAGTCTCCACGGAACGATGCTTCCGGAGAAACAGCCACCGCGGTTGCCGC
 CACACAATCGCCGCCAAAGGAGACTTCTGAGACAGTACCGGAGATTTCCGATAAAGGTGGAGCGATTGTGC
 GAGTTGATGTGCAGCAAAGGCCGCTGCGTAGATACATGTACTCGAATATCTCTGACCGAGCTAAGCTGATTG
 AAGAGCTTCCCTGCAGCTCTGAAGCTAGCCAAGGAGCCAGCTAAGTTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAAGTT
 TTTCTTACAAGGGCGCAAAGCTTATGCGAGTGATTCCCATATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTTCGCTTCTT
 ATTCTCGAGTGTTATCTTCTAATGCTTGATCCCTAGCGAAGAGAAGAAGCCATTGATGGTTCTATCAAGG
 ATGAAGCCGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAACGAAGGTAGGTTAGCTGCGGCAGA
 GGCAATGGACGCAAGGGGTTGCTTCTGCTAATTGCTTGTTTTTGGGATTCCTTCGAGCTTTAAGAGTATG
 GATTTGTTTGATCTGGTACGGAAGAGTGGTACTGCTGAGATTGCTGCTGCTCTAAAACGGTCACCTTTCC
 TTGTCCCTATGATGTCAGGTATCATCTTCTTTCTTGAGTCGATGAGTTCCATTACAAAGGTGGTTTTCTT
 TTGTTGCAGAAATGGGTCAGGATTAAGTTCCCATCTTTATTTTTTGTTCCTTATAAGATCTTAAGAGTAGA
 ATCATCTGCAGTTAACAATGAAAGAAAATGGCATTTTAGAGTGCAATTGCCTTGGAAGTAGATCATATGA
 CTGTTCTGTTGCATGCTAATTAAGCATTGAGTAATGTTTCGATGAAAGGGTTTAGTAACTGGTCCCTAACAC
 ATTATTCTATCGGTCGTAGGTATAGTTGATTTAAGTATCAAGCGTGGAAAGCATATTGAAGCACTGGGA
 TGATTTATACCTTTGGGATAGAGGATAGGTTTTCCGCTTCTTCGCTTCTAACTTCATTCCTAAGGATGAG
 CAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAACAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTTGTATGGCCCTTCTTAGCT
 ACCTTCATTGACTCTCTTTTTTTTTTCTTTTTCTGATTCTTACCATTGTTTGCCTTTTGTCTCTTAAACA
 GAAAGAGGCCAACCAAAAGTTTTTTAGCTGCCTTGTTATCAGTGATGAAGTGTTTGGAGGCTCACAACCTTA
 GACCCAGAGAAAGAAGTACAAGGATGGCAGATCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATCTTC
 AACTCGACAAAACAGATGCAAGGGGAAGCAAGATCCATCAGTTTAATGGAGGAAACAGCATTGACGAAGAG
 ATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCCTCATCT
 TATTCTTCTACCTACCCTGCCCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTA

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

GTTACCTCGAGCCTTCACCAGGTTTTCTCATCGGTCAAGTCTCAGGAGTCCCCTGAATATTTAGCTCC
ACCTAGTGGTTTAGGAAGAAGTGTACCTGCATATGAGCATCTGCCTCCAACCTTCTTACCTTCCCCTTCCA
AGACGGCACTCTCCGGTTCACGGACAGAGACTTCTGGAGAGTACTCTCCTCCTATTCATGGGCAAGAAC
AAATATCATATGGTCGTCTACAAAGGGTTACAGACATTCACCATCTGTAGAAAGATACTTGGCTTTGCC
CAATCACAGGTCTCCTCGTAACTCATAAAAAACACCACATCGGAGGAATGTAA

BankIt* *Brassica carinata* BcaB.FRI.a FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-a-1 allele, complete cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGAGGGTTAGCTGCAGCAGAGGCTATGGACGCC
AGGGGTTTTGCTTCTGCTTGTGCTTGTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAATATGGATCTGTTGGATT
TGATTAGGAAGAGTGGGACTGCTGAGATTGATGGTGTCTGAAACGGTCGCCTTTTTCTTGTCCCTATGAT
GTCAGGTACCTTGTCTTTTTCTTGAGTTGATGAATTTACGTTATAAATTTGGGAGTAGTGTTTTTTTGATA
TTGCAAGTTAAAATCATGGGACTTTGCTGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTCAAGGTG
GTTTTCTTTCGATGAAGAATGGGTTGGAATCAAGGTTTCATCTTTGTTTTAGTTTTGGCATATGAGCTTGT
GAATTGGATTCTATGTACCCTGCAATGAATACTACATAATCCTTGAGCAATGGCTCTGCTGTTGCTTACT
TGATAAGCCTTGAGCAGTGTGACTAAAAGGGTTTCTATCGGAACGTAGGTATAGTGGATTCAAGTATCA
AGCGTGGACTGCATATCGAAGCTCTTGAGATGGTTTTATACCTTTGGGATGGAGGAGAGGTTTTTCACCTTC
TTCAATTCTAAGTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAATCATTCGAGAGAGCGAAACGTAAAGCACAAGCA
CCCAAGGCATTTGTATGACAACTCTTCTTTGCCTTTTTTTTTTTTTCTTTTTCTGATTGCTTACCCTTAT
TTGCTTTTCATTTCTCTCAACAGAAAGAGGCGAACGAAAAGCAGTTAGATGCGTTGTTATCAGTGATGAA
GTGCTTGGAGGCTCACAAGTTAGACCCAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAGATGGTG
AAGCTTGAGAAAGACATTGCTCAGCTCGACAAGAAGATGGAGGAGGAAGCGAGAGCCATCAGCCTAATGG
AGGAGGAAGCGGCACTTAACAAGAGAGTGTATACCCAACAGGTGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGA
AATTCCACCACCAATAGTTTCTCTCATCTTATTCTCTATATACCGTGACCACCGAAGCTTCTCTAGCCAC
AGAGACGGAGAAACAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGCTACCTCGGCTCATCATCAGGTTTTCTC
ACCGGTCAAGTCTCGGGAGATCCCCTGAGTACATGGTTCCATCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTGTATGC
GTATGATCATCTACCTCCAAATTCCTACTCTCCGGTTCCAAGACAGCATTCCCCCGTTTACGGACAGAGA
CTTCATCAAGAGTACTCTCTCCAGTACACCAAATGCCATATGGTCTGCAAAGAGTTTATAGGCATTCAC
CATCTGTAGAAAGGTACTIONTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KJ145234 *Brassica juncea* BcaB.FRI.b FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-a-1 allele, complete cds

ATGGCCTTTTCGTAATGGTTCTCTGATCCCTGCCCATGATCCATCCACGAGGGAAAATCAATCATCATCGC
CGACCATAACAACGGGGAACCGTGCCTACAAACACTGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCTCAATT
TTTGAAATCGATCGACGATTTAACTGCGTTTTTCAGCTGCAGTGGACGCCCTCAAACGCCACTACGACGAC
TTGCAAAGCCACATGGATTACATCAAGAACGCCATTGACTCCAGTCTCAAGAGCAAAGGCATCACCGCCG
AGTCTCCCTCCTCCCGATCGCAGTCTCCACGAAACGATGCTTCCGGAGAAACGGTTGCTGCCACACAATC
GCCGCCAGTAGCGGAGAAGGTGGAGCGATTGTGCGAGTTGATGTGCAGCAAAGGCCTGCGTAGATACATG
TACTCGAATATCTCTGACCGAGCTAAGCTGATTGAAGAGCTTCTGAGCTCTGAAGCTAGCCAAGGAGC
CTGCTAACTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAAGTTTTACTTACAAGGGCGCAAAGCTTATGCGAGTGATTC
CCATATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTTCGCTTCTGATCCTGGAGTCTTATCTTCTAATGCTTGATCCGAAG
CCCCTTGATAGAGGTTCTATCAAGGATCAAGCCGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGA
GCGAACGAAGGTTAGCTGCGGCAGAGGCAATGGACGCTAGGGGTTTTGCTTCTGCTAATGCTTGTGTTTTGG
GATTCCTTCGACTTTTTCGAGTATGGATTTGTTTTGATCTGGTACGGAAGAGTGGTGCTGCTGAGATTGCT

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

GCTGCTCTAAAACGGTCACCTTTCCTTGTCCCTATGATGTCAGGTATCATCTTTTTTCTTGAGTTCGATGA
GTGGAGTTTTCTTTGTGGCAGAATGGGTCCAGATTCCAGTTCATCTTTATTTTTGCTTCSTTATAAGAG
CTTAAGAGTATTTTAGAGTGCAATTGCCTTGAAGTAGATCATATGACTCTTCTGTTGCATTGAGTAATG
TTCGATGAAAGGGTTTAGTAAGTGGTCCAAACACAATATTTCTATTGGTTGTAGGTATAGTTGATTCAAGT
ATCAAGCGTGGAAAGCATATTGAAGCTCTTGGTATGATTTATACCTTTGGGATAGAGGATAGGTTTTCGG
CTTCTTCGCTTCTAACTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAAACAGAAAGCTCA
AGCACCGATAGCATTTGCATGTCCCTTCTTTACACATTAGCTACCTCTTCACTGACTCTTTTTTTTCTCT
TCTGATTTCGTACCATTGTTTGCCTTTTGTCTCTTAAACAGAAAGAGGCCAACCAAAAGTTTTTAGCTGCG
TTGTTATCAGTGATGAAGTGTGGAGGCTCACAACCTTAGACCCAGAGAGAGAAGTTCAGGGTGGCAGA
TCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAGACATTATTCAACTCGACAAACAGATGGAAGGGGAAGCAAG
ATCCATCAGTTTAATGGAGGAAGTGGCATTGACGAAGAGATTCTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGG
TTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCTCATCTTATTCTTCTACCTACCCGGACCGAAGCTTCC
CTAGTCACAGAGACAATGAAATATCAGCTCTTGTCTAGTAGTTACCTCGGCCCATCATCAGGTTTTCTCTCA
TCGTTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATATTTAGCTCCATCTAGTGGGTTAGGAAGAAGTGTACCTGCA
TATGAACATCTGCCTCCAAATTTTACCTTCCCCTTCCAGGACGGCACTCTCCGGTTCAGGACAGAGAC
TTCTGGAGAGTACACCCCTCCAATTCATGGGCAACAACAATACCATATGGTCTACAAAGGGTTTACAG
ACATTCACCATCTGTAGAAAGATACTTGGCTTTGCCCAAAATCAGGTCTCCTCGTAACTCATAAGAAGAC
CACATAAGAGGAATGTAA

KC937068 *Brassica juncea* var. *juncea* BjuA.FRI.a FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.a-1 allele, complete cds

ATGGCCGTCCGTAATGGTTCTCTGCTCCCTGCTCCATCAACAAGGGAGGAGGAGCAACCTTCATCGGCGA
TGATCCAACGGAGAGAAGCGCAGGCTACTGTGCAAACCGTGCCTACAAACATCGAAACCACGATCGAACA
ATCTAACGATCCTCAGTTTTTGAATCCATCGTTCGACTTAACCGCGTTAGCAGCCGCGGTCGACGCCCTC
AAACGCCGCTACGACGAACTGCAGAGCCACATGGATTACATCGAGAACGCGATCGACTCCAATCTCAAAA
CTAACGGCATCATCGAAACCGCCGCGGTCGCTCCTCCGCCGAACAAACAGCCACGGCGATTGCGTG
CCAATCGCCGCCAAGGAGAAGTCCGAAGCGGAGCGATTCTGCGAGTCGATGTGGAGCAAAGAGCTTCGA
AGGTACATGTTGCGTGAACATCTCTGAGCGAGCCAAGCTAATCGAAGAGATTCTGGAGCGTTGAAGCTGG
CCAAGGACCCGGCGAAGTTTCGTGTTGGACTGCATCGGGAAGTTTTACTTGCAAGGGCGCAAAGCCTTCGC
CAACGATTTGCCGCGATCACCGCGAGGAAGTTTTGCTTCTTATCCTGGAGTGTACCTTCTGACGTTT
GATCCTGAGGGAGAGAAGAAGAAGCTTTTGGTTAGTTCTGTGAAAGATGAGGCGGAGGCGGCTGCTG
TTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGATGGTTGGGTGCAGCGGAGGCTATGGACGCAAGGGGTTT
GCTTCTGTTGGTTGCTTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTGGATTTGATTAGG
CAGAGTGGTACTGATGAGATTGTTGGTGTCTTAAACGGTCACCGTTTCTTGTCCCTATGATGTCAGGTA
CCTTGTCTTTTTCTTGAGTACGTTACAAAGTGGTTTTCTTTGTTGTGGAATGGGTAGAGTCAAGTTTTT
CATCTTTGTGTTTGGTTGTTTATATGATTTTGGGAGTAGAATTTTACGTACCATGCAATGAGATAGGACA
GAACATGGCATTCTAGAATGCAATGACAAGTTGTAAAGCTGCACATTCGATATTGCAAGTTCAAAATCATT
TGACTTTTATGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTAAAAGGATCTTAATACAATAATCTT
TTGGCCGTATAGGTATAGTTGATTCAAGTATCAAGCGTGGAAATGCATATTGAAGCTCTTGAGCTGGTTTA
TACCTTTGGGATGGAGGATAGGTTTTTACCTTCTTCAATTCTAACTTCCTTCCCTAAGGATGAGGAAGGAT
TCATTTGAGAGGGCGAAACGTCAAGCACAAAGCACCATGGCATCTGTATGACTCTTCTTTACTCGTTGTT
TACCTTGATAAACTCTTTTTTCTGTTCTGATTCTTATCGTTGTTTGGTTTTTTTATTTTCTCAACAGAAA
ACTGCGAACGAAAAGCAGTTGGATGCGTTATCATCAGTGATGAAGTGTGGAAAGCTCACAAGTTAGACC
CAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGGCCAAGCTTGAGAAAGACATTGTTTCAGCT
TGACAAACAGATGGAGGAAGCGAGATCTATCAGTCGAATGGAGGAAGCGAGATCCATCAGTCGAATGGAG

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

GAAGCGAGATCCATCAGTATAAGGGAGGAAGCGGCAATTAGCGAGAGATTGTATAACCAGCAGATGAAAC
GTCCAAGGTTGTCAGAAATGAAATGCCACCAACAGCTGCCGCATCTTATTCTCCGATGTACCGCGACCA
CCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGAGGGAGATGCAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCTCGGC
CCATCATCAGGTTTTCTCATCGGTGAGTCTTATGAGATCCCCTGAATATATGGTTCCACCTGGTGGGT
TAGGAAGAAGTGTGTCTGCGTATGATCATCTGCCTCCAAATCTTATCTCCGGTTCACGGACAGAGACG
TCCTCAAGAGTACCCTCCTCCAGTTCATGGGCAACATCAAATGCCATATGGTCTATACAGACATTCACCA
TCTGTAGAAAGACACTTGGCTTTGTCCAATCACAGGACCCCTCGTAACTTATCACAAGACCGCATAGGAG
GAATGTAGAATATTTAACATTCAGTTTTTGTTTTTCAAAGAAACCACAAAATTTATTGTTTTTGTTTTTT
AAAGAAACCACAAAATATATTTAAAGCTTAGGGCTTAACAAGCAGAAAAGCTT

KJ649746 *Brassica juncea* var. *juncea* BjuA.FRI.b FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.b-1 allele, complete cds

ATGGCCTTTCGTAATGGTTCTCTGATCCCTGCCCATGATCCATCCACGAGGGAAAATCAATCATCATCGC
CGACCATAACAACGGGGAACCGTGCCTACAAACACTGAAATCACGATCGAACAATCTAACCATCCTCAATT
TTTGAAATCGATCGACGATTTAACTGCGTTTTTCAGCTGCAGTGGACGCCTTCAAACGCCACTACGACGAC
TTGCAAAGCCACATGGATTACATCAAGAACGCCATTGACTCCAGTCTCAAGAGCAAAGGCATCACCGCCG
AGTCTCCCTCCTCCCGATCGCAGTCTCCACGAAACGATGCTTCCGGAGAAACGGTTGCTGCCACACAATC
GCCGCCAGTAGCGGAGAAGGTGGAGCGATTGTGCGAGTTGATGTGCAGCAAAGGCCTGCGTAGATACATG
TACTCGAATATCTCTGACCGAGCTAAGCTGATTGAAGAGCTTCCTGCAGCTCTGAAGCTAGCCAAGGAGC
CTGCTAACTTCGTGTTGGAATGCATTGGCAAGTTTTACTTACAAGGGCGCAAAGCTTATGCGAGTGATTC
CCATATGATCCCTGCGAGGCAGGTTTTCGCTTCTGATCCTGGAGTCTTATCTTCTAATGCTTGATCCGAAG
CCCCTTGATAGAGGTTCTATCAAGGATCAAGCCGAGGCGGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGA
GCGAACGAAGGTTAGCTGCGGCAGAGGCAATGGACGCTAGGGGTTTGCTTCTGCTAATTGCTTGTTTTGG
GATTCCTTCGACTTTTTCGAGTATGGATTTGTTTTGATCTGGTACGGAAGAGTGGTGCTGCTGAGATTGCT
GCTGCTCTAAAACGGTCACCTTTCCTTGTCCCTATGATGTCAGGTATCATCTTTTTTCTTGAGTCGATGA
GTGGAGTTTTCTTTTGTGGCAGAATGGGTCAGGATTCAGTTCCCATCTTTATTTTTGCTTCCTTATAAGAG
CTTAAGAGTATTTTAGAGTGCAATTGCCTTGAAGTAGATCATATGACTCTTCTGTTGCATTGAGTAATG
TTCGATGAAAGGGTTTAGTAACGGTCCAAACAATATTTCTATTGGTTGTAGGTATAGTTGATTCAGT
ATCAAGCGTGAAAGCATAATTGAAGCTCTTGGTATGATTTATACTTTGGGATAGAGGATAGGTTTTTCGG
CTTCTTCGCTTCTAACTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAAACAGAAAGCTCA
AGCACCGATAGCATTTGCATGTCCCTTCTTTACACATTAGCTACCTCTTCACTGACTCTTTTTTTCTCT
TCTGATTCGTACCATTGTTTGCCTTTTGTCTCTTAACAGAAAGAGGCCAACCAAAAGTTTTTAGCTGCG
TTGTTATCAGTGATGAAGTGTGGAGGCTCACAACCTTAGACCCAGAGAGAGAAGTTCAAGGGTGGCAGA
TCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAAGACATTATTCAACTCGACAAACAGATGGAAGGGGAAGCAAG
ATCCATCAGTTAATGGAGGAAGTGGCATTGACGAAGAGATTCTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGG
TTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGCAGCTTCCTCATCTTATTCTTCTACCTACCCGGACCGAAGCTTCC
CTAGTCACAGAGACAATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGTTACCTCGGCCATCATCAGGTTTTCTCTCA
TCGTTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATATTTAGCTCCATCTAGTGGGTTAGGAAGAAGTGTACCTGCA
TATGAACATCTGCCTCCAAATCTTACCTTCCCCTTCCAGGACGGCACTCTCCGGTTCAGGACAGAGAC
TTCCTGGAGAGTACACCCCTCCAATTCATGGGCAACAACAATACCATATGGTCTACAAAGGGTTTACAG
ACATTCACCATCTGTAGAAAGATACTTGGCTTTGCCAAAATCAGGTCTCCTCGTAACTCATAAGAAGAC
CACATAAGAGGAATGTAA

BankIt* *Brassica juncea* var. *juncea* BjuB.FRI.a FRIGIDA-like protein (FRI) gene, FRI.a-1 allele, complete cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAGAGGCTGGTGGGTGAAGGAGGGTTAGCTGCAGCAGAGGCTATGGACGCC
 AGGGGTTTGCTTCTGCTTGTGCTTGTGTTTTGGGATTCCGGAGAGCTTTAAGAATATGGATCTGTTGGATT
 TGATTAGGAAGAGTGGGACTGCTGAGATTGATGGTGTCTGAAACGGTCGCCTTTTCTTGTCCSTATGAT
 GTCAGGTACCTTGTCTTTTCTTGAGTTGATGAATTTACGTTATAAAATTTGGGAGTAGTGTTTTTTGATA
 TTGCAAGTTAAAATCATGGGACTTTGCTGTTGCATACTACATAAGCCTTGAGCAATGTCTACTCAAGGTG
 GTTCTTTTCGATGAAGAATGGGTTGGAATCAAGGTTTCATCTTTGTTTTAGTTTGGCATATGAGCTTGT
 GAATTGGATTCTATGTACCCTGCAATGAATACTACATAATCCTTGAGCAATGGCTCTGCTGTTGCTTACT
 TGATAAGCCTTGAGCAGTGTGACTAAAAGGGTTTCTATCGGAACGTAGGTATAGTGGATTCAAGTATCA
 AGCGTGGACTGCATATCGAAGCTCTTGAGATGGTTTATACCTTTGGGATGGAGGAGAGGTTTTTCACCTTC
 TTCAATTCTAAGTTCATTCCTAAGGATGAGCAAGGAATCATTCGAGAGAGCGAAACGTAAAGCACAAGCA
 CCAAGGCATTTGTATGACAACTCTTCTTTGCCTTTTTTTTTTTTCTTTTTCTGATTGCTTACCCTTAT
 TTGCTTTTCATTTCTCTCAACAGAAAGAGGCGAACGAAAAGCAGTTAGATGCGTTGTTATCAGTGATGAA
 GTGCTTGGAGGCTCACAAGTTAGACCCAGCGAAAGAAGTACCAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAGATGGTG
 AAGCTTGAGAAAGACATTGCTCAGCTCGACAAGAAGATGGAGGAGGAAGCGAGAGCCATCAGCCTAATGG
 AGGAGGAAGCGGCACTTAACAAGAGAGTGTATACCCAACAGGTGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGA
 AATTCCACCACCAATAGTTTCTCATCTTATTCTCTATATAACCGTGACCACCGAAGCTTCTCTAGCCAC
 AGAGACGGAGAAACAGATGAAATATCAGCTCTTGTGAGTAGCTACCTCGGCTCATCATCAGGTTTTCTC
 ACCGGTCAAGTCTCGGGAGATCCCCTGAGTACATGGTTCATCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTGTGTATGC
 GTATGATCATCTACCTCCAAATTTCTACTCTCCGGTTCCAAGACAGCATTCCCCGGTTTACGGACAGAGA
 CTTTCATCAAGAGTACTCTCTCCAGTACACCAAATGCCATATGGTCTGCAAAGAGTTTATAGGCATTCAC
 CATCTGTAGAAAGGTACTIONTTGGCTTTGTCCAATCACAGGA

KJ145235 *Brassica carinata* BcaB.FRI.b FRIGIDA-like protein (FRI.b) gene, FRI.b-2 allele, partial cds

GGCTGCTGTTGCGTGGAAGAAAAGGATGATGAACGAAGGAAGGTTAGCTGCGGCGGAGGCGATGGACGCA
 AAGGGTTTGCTTCTGCTAATTTCTTGTGTTTTGGGATTCCCTCGAGCTTTAAGAGTATGGATTTGTTTGATT
 TGGTACGGAAGAGTGATACTCATGAGATTGCTGCTGCTCTAAAACGCTCACTTTTCTTGTCCSTATGAT
 ATCAGGTATCATCTTCTTTCTAGTTTTCGATTACCAAGGTGGTTTTCTTTTGTGTTAGAAATGGGTCAGGATT
 AAGTTCCCATCTTTGTTTTCTGGTTGCGTATATGAGCTTAATAAGAGTAGAATCATATGTACTCTGCAATA
 AACTATGACACAAAATGACTCTTCTGTTGCATACTTTAAGCATTGAGTTATGTTTCGATTAAAGGGTTTAG
 TAACAGGTCCTAACACAATGTTCTATCGGTCGTAGGTATTGTTGATTATAGTATCAAGCATGGAAAGCAT
 ATTGAAGCGCTTGAGATGGTTCATACCTTTGGGATTGAGGATAGGTTTTTCAGCTTCTTCGATTCTAACTT
 CATTCCTAAGGACGAGCAAGGAGTCATTTGAGAGGGCAAAAAGAAAGCTCAAGCACCGATAGCATTTGT
 ATGCCCTTCTTTACACATCAGCTACCTTCATTGACTCTTCTGATTCTTACCATTGTTTGCCTTTTATTC
 TCTTAACAGAAAGATGCGAACCAGAAGTTTTTAGCTGCGTTGTTATCAGTGATGAAGTGTGTTGGAGGCTC
 ACAACTTAGACCCAGAGAAAAGAAGTACAAGGGTGGCAGATCAAAGAGCAAATGATTAAGTTGGAGAAAGA
 CATTCCTTCAGCTCGATAAACAGATGGAAGGGCAAGCAAGATCCATCAGTTTAGTGGAGGAAGCGGCATTG
 ACGAAGAGATTGTATAACCAACAGATGAAACGTCCAAGGTTGTCAGACATGGAAATGCCACCAGTAGCTT
 CCTCGTCTTATTCTTCTACCTACCCTGACCGAAGCTTCCCTAGTCACAGAGACGATGAAATATCAGCTCT
 TGTCAGTAGTTACCTCGGCCATCATCAGGTTTTCTCATCGGTCAAGTCTCAGGAGATCCCCTGAATAT
 ATAGCTCCAACCTGGTGGGTTAGGAAGAAGTATACCTACGTATGAACATCTGCCTCCAAATTTCTTACTCTC

ПРИЛОЖЕНИЕ (продолж.)

CGGTCCAAGAGGGCACACTCTAGTTCATGGACAGAGACTTCSTCAAGAGTACACTCSTCCAGTTCATGG
GCAACAACAAAATACCATATGGTCTTCAAAGGGTTTACAGACATTCACCATCTGCAGAAAGATACTGGCT
TTGTCCAATCACAG