

**ЧЕРНООК АНАСТАСИЯ ГЕННАДЬЕВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ-  
РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАЗВИТИЯ У КОРОТКОСТЕБЕЛЬНЫХ ФОРМ  
ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ**

Специальность: 1.5.7 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва.

**Научный руководитель:**

**ДИВАШУК Михаил Георгиевич**

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

**Официальные оппоненты:**

**ЛЕОНОВА Ирина Николаевна**

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофортификации пшеницы, старший научный сотрудник лаборатории геномной селекции растений Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

**ТЮРИН Александр Александрович**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: г. Москва, улица Губкина, д. 3, 119991 Тел: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41. Факс: (499) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН и на сайте [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru).

**Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года.**

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук

Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является третьей по важности продовольственной культурой в мире после кукурузы (*Zea mays*) и риса (*Oryza sativa*). Это наиболее широко выращиваемая культура на всей планете. Зерно пшеницы является жизненно важным источником белков, углеводов, витаминов и минеральных элементов. Пшеница используется не только в пищевой промышленности, но и как сырьё для приготовления спирта, крахмала и корма для животных (Nhemachena et al., 2017).

Тритикале (*Triticosecale* Wittmack) — относительно молодая зерновая культура, созданная путём скрещивания пшеницы с рожью. За последние пять лет в Российской Федерации общая площадь, занимаемая этой культурой, составила в среднем 225 000 га, а её урожай — 7% от урожая всех сельскохозяйственных культур в Восточной Европе (FAOSTAT). В России тритикале в основном используется для производства кормов и спирта.

Существенное повышение урожайности пшеницы в период 40–60-х годов XX века было связано с внедрением в производство короткостебельных сортов, устойчивых к полеганию, благодаря использованию мутаций короткостебельности, связанных с нечувствительностью растений к гиббереллинам — *Rht-B1b* (*Rht1*) и *Rht-D1b* (*Rht2*) — «Зелёная революция». Однако, получение высоких урожаев было возможным только при увеличении внесения доз азотных удобрений и орошении. На сегодняшний день наиболее распространены среди сортов пшеницы гены снижения высоты *Rht1*, *Rht2*, *Rht11* несмотря на то, что известно 25 генов этой группы. В селекции тритикале также стали интенсивно использоваться гены низкостебельности, в частности, ген ржи *Ddw1*. Обратной стороной использования генов короткостебельности стало уменьшение размера и массы зерновки, удлинение сроков цветения и колошения, а также снижение эффективности использования почвенного азота. Следовательно, поиск новых генов короткостебельности и генов-компенсаторов негативных эффектов генов гиббереллин-зависимой и гиббереллин-независимой короткостебельности является важной и актуальной задачей. В нашей работе в качестве таких генов мы рассматриваем гены-регуляторы роста *GRF*, гены яровизации *Vrn* и фотопериодизма *Ppd*.

Впервые ген *GRF* был идентифицирован у риса как *OsGRF1*; он кодирует белок, регулирующий ответ на гормон гиббереллин, вызывающий удлинение стебля, также

продукты экспрессии этого гена стимулируют работу генов азотного обмена (van der Кнаар et al., 2000). Работы по изучению генов *GRF* показывают, что их сверхэкспрессия в кукурузе и рисе приводит к увеличению размеров листьев и зерновки (Che et al., 2015; Duan et al., 2015; Li et al., 2016; Nelissen et al., 2015). Поиск аллельных вариантов генов азотного обмена, способных продолжать активно экспрессироваться даже в короткостебельных формах, является актуальной задачей на сегодняшний день.

**Цель исследования:** Изучение фенотипического проявления совместного присутствия генов короткостебельности и потенциальных генов-компенсаторов, их негативных эффектов у пшеницы и тритикале.

**Задачи:**

1. Секвенировать нуклеотидные последовательности генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, включая 5'- и 3'-нетранслируемые и промоторные области, у набора фенотипически различающихся образцов пшеницы, и гена *TaGRF3-2D*, включая 5'- и 3'-нетранслируемые и промоторные области, у набора фенотипически различающихся образцов пшеницы и *Aegilops tauschii*.
2. Провести биоинформатический анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* и *TaGRF3-2D* на наличие и характер полиморфизмов.
3. Создать молекулярные маркеры на основе выявленных полиморфизмов генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* и *TaGRF3-2D*, способных идентифицировать их аллельные варианты.
4. Определить аллельное состояние изучаемых генов *TaGRF3* в коллекции пшеницы, *Ae. tauschii* и рекомбинантных линий тритикале.
5. Методами ассоциативной генетики определить влияние аллельного состояния генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* и *TaGRF3-2D* на хозяйственно-ценные признаки мягкой пшеницы.
6. В полевых опытах в условиях Московской области (Центральный регион Нечернозёмной зоны) на рекомбинантных инбредных линиях определить влияние аллельного состояния гена *TaGRF3-2A* в присутствии гена короткостебельности *Ddw1* на хозяйственно-ценные признаки гексаплоидной тритикале.
7. Определить влияние генов, компенсирующее негативные эффекты гиббереллин-чувствительных и гиббереллин-нечувствительных генов короткостебельности, со

стороны генов-компенсаторов *TaGRF3-2A*, *Vrn-A1*, *Rht-B1*, *Ppd-D1* у пшеницы и гексаплоидной тритикале.

**Научная новизна.** В результате секвенирования впервые получены уникальные нуклеотидные последовательности генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D*. Созданы молекулярные маркеры для аллелей генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D*. Впервые показано влияние аллелей генов *TaGRF3-2A* и *TaGRF3-2D* (только для пшеницы) на элементы продуктивности пшеницы и тритикале. Впервые показан компенсаторный эффект аллелей генов *TaGRF3-2A*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Ppd-D1* как для гиббереллин зависимых, так и для гиббереллин независимых генов короткостебельности у растений пшеницы и тритикале. Создан новый кодоминантный CAPS маркер для выявления аллелей гена *Ddw1*. Сорт мягкой пшеницы Новосибирская 67 несёт редкую мутацию гена *TaGRF3-2A* (9-нуклеотидная делеция во втором экзоне гена), не обнаруженную ни у одного другого изучаемого нами сорта из коллекции.

**Теоретическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что получены данные о системном и разностороннем влиянии генов-регуляторов роста *TaGRF3-2A* и *TaGRF3-2D* на архитектуру растения, наступление фенологических фаз и развитие репродуктивных органов у пшеницы и (только *TaGRF3-2A*) тритикале. Показано взаимодействие генов-регуляторов роста *TaGRF3-2A* с генами реакции растений на температурный режим *Vrn-A1* и фотопериодизм *Ppd-D1*, с генами гормонального статуса, обеспечивающих низкостебельный габитус пшеницы и тритикале. Полученные данные расширяют наше представление о взаимодействии между генами ответа растений на внешние и внутренние сигналы в ходе онтогенеза.

**Практическая значимость работы** заключается в возможности использования разработанных молекулярных маркеров для генов *Ddw1*, *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D* при создании новых коммерчески успешных сортов тритикале и пшеницы. Получен ценный семенной материал яровой гексаплоидной тритикале, охарактеризованный по аллельным вариантам генов *TaGRF3-2A*, *Ddw1*, *Vrn-A1*, и яровой мягкой пшеницы, охарактеризованный по аллельным вариантам генов *TaGRF3-2A*, *Rht-B1*, *Ppd-D1*, *Vrn-B1*, который можно использовать в селекционном процессе.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. По степени variability нуклеотидных последовательностей проанализированные гены можно выстроить в ряд *TaGRF3-2A*>*TaGRF3-*

2B>*TaGRF3-2D*. Сорты и линии пшеницы и тритикале различаются между собой по аллельному состоянию генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* и (только для пшеницы) *TaGRF3-2D*.

2. Аллель 5'-UTR-238 гена *TaGRF3-2D* мог возникнуть в ходе эволюционных процессов внутри генома гексаплоидной пшеницы, так как не встречается в геноме *Ae. tauschii*.
3. Аллельное состояние генов *TaGRF3-2A* и *TaGRF3-2D* (только у пшеницы) влияет на элементы продуктивности у пшеницы и тритикале.

**Личный вклад автора.** Представленная диссертационная работа является результатом пяти лет научных исследований автора. Вся лабораторная работа выполнялась автором непосредственно. Полевые работы: посев, учёт фенологических фаз, прополка сорняков, уборка урожая вручную проводились под контролем и участием автора. Статистическая обработка и представление результатов проводились автором самостоятельно.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Результаты диссертационной работы были представлены на 13 российских и международных конференциях: The 7th International Scientific Conference PlantGen, 10-15 июля, 2023, Казань; Проблемы селекции – 2022, 12-15 октября, Москва; V Вавиловская Международная конференция, 21-25 ноября, 2022, Санкт-Петербург; The 6th International Scientific Conference PlantGen, 14-18 июня, 2021, Новосибирск; Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии, 27-29 октября, 2020, Москва; Вавиловские Чтения – 2019, 25-26 ноября, Саратов; The 5th International Scientific Conference PlantGen, 24-29 июня, 2019, Новосибирск; Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 150-летию А.В. Леонтовича, 3-6 июня, 2019, Москва; Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии, 15-16 апреля, 2019, Москва; VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 18-22 июня, 2019, Санкт-Петербург; Генофонд и селекция растений, 4–6 апреля, 2018, Новосибирск; Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии, 19–20 апреля, 2018, Москва; 71-я международная студенческая научно-практическая конференция, посвящённая 130-летию со дня рождения А.В. Чайнова, 20–23 марта, 2018, Москва;

**Публикации.** Результаты исследования представлены в 8 рецензируемых зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК и/или входящих в перечень Web of Science/Scopus.

### **Структура и объем работы.**

Диссертационная работа изложена на 214 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, выводы, благодарности, список литературы и приложения. Иллюстративный материал диссертации представлен в виде 13 таблиц и 42 рисунков, 11 приложений. Список литературы включает 287 литературных источников, из которых 249 источников зарубежной литературы.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность к.б.н. Баженову Михаилу Сергеевичу за помощь в обработке результатов секвенирования и подборе праймеров; к.б.н. Крупину Павлу Юрьевичу за координацию работы в течение всего срока проведения исследования; Крупиной Александре Юрьевне и Вукович Милене за помощь в выполнении полевого фенотипирования; Беспаловой Людмиле Андреевне за предоставление семенного материала и данных полевого фенотипирования коллекции сортов мягкой пшеницы из НЦЗ имени П.П. Лукьяненко; Чикиде Надежде Николаевне и Гончарову Николаю Петровичу за предоставление семенного материала коллекции *Ae. tauschii*. Особую благодарность автор выражает научному руководителю к.б.н. Дивашуку Михаилу Георгиевичу за помощь и активное участие на всех этапах данного исследования. Исследования, представленные в данной работе, были выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-316-90046).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В этой главе приведено теоретическое обобщение научной литературы, посвященной систематике, происхождению, значимости тритикале и пшеницы для мирового сельскохозяйственного производства. Показано значение генов короткостебельности *Rht* и *Ddw1* для селекции этих культур. Описаны плеiotропные эффекты известных генов короткостебельности на хозяйственно-ценные признаки пшеницы и тритикале. Указана значимость поиска и изучения новых генов

короткостебельности, а также поиска и изучения генов-компенсаторов негативного влияния генов на признаки растений. Приведена характеристика генов *Vrn*, *Ppd*, *GRF*.

## ГЛАВА 2. УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Растительный материал

Для секвенирования генов *TaGRF3* использовали сорта и линии мягкой озимой и яровой пшеницы, образцы *T. spelta*, *T. dicoccoides*, *T. urartu*, а также *Ae. tauschii*. Сорта озимой и яровой гексаплоидной тритикале, рожь использовали для секвенирования *Ddw1* (таблица 1).

Таблица 1. Растительный материал, используемый в работе

Название растительного материала	Источник
Сорта и линии мягкой озимой пшеницы (199 шт.)	
Сорта озимой тритикале: Хонгор, Валентин 90, Мудрец, АД зелёный, Дозор; сорта яровой тритикале: Соловей Харьковский, Дублет; рожь ЕМ1; образцы <i>T. spelta</i> , <i>T. dicoccoides</i> и <i>T. urartu</i>	Любезно предоставлены НЦЗ имени П.П. Лукьяненко, Краснодар (Беспалова Л.А.)
Сорта яровой пшеницы из Сельскохозяйственной станции Министерства Науки и Техники Республики Ирак: (9 шт.)	Любезно предоставлены кафедрой техносферной безопасности Аграрно-технологического института РУДН, Москва (Семёнов О.Г.)
Линия пшеницы Chris Mutant	Любезно предоставлены Университетом Сельского хозяйства, Ибараки, Япония (Нобуёси Ватанабэ)
Коллекция <i>Aegilops tauschii</i> (37 шт). Образцы различного экологического и географического происхождения: <i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i> , <i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>typica</i> , <i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i> var. <i>typica</i> , <i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i> var. <i>anathera</i> , <i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i> , <i>Ae. tauschii</i> var. <i>meyeri</i> .	Любезно предоставлены Федеральным Научным центром Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) (Чикида Н.Н.) и Институт цитологии и генетики СО РАН (Гончаров Н.П.)

Для изучения эффектов аллелей генов на хозяйственно-ценные признаки наряду с коллекцией пшениц использовали рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы и яровой тритикале (различающиеся по аллельным вариантам генов *Rht-B1*, *Vrn-B1*, *Ppd-D1*, *TaGRF3-2A* – для пшеницы; *Rht-B1*, *Ddw1*, *Vrn-A1*, *TaGRF3-2A* – для тритикале): Пшеница: ♀(озим.) Chris Mutant x ♂(яр.) Новосибирская 67 (2018 год – 1021 линий, 2019 год – 557 линий); Тритикале: ♀(озим.) Хонгор x ♂(яр.) Дублет (2018 год – 751 линий, 2019 год – 1366 линий); ♀(озим.) Мудрец x ♂(яр.) тритикале Дублет (2018 год – 318 линий); ♀ (озим.) Валентин 90 x ♂(яр.) Дублет (2018 год – 407 линий).

## 2.2 Получение рекомбинантных инбредных линий яровой мягкой пшеницы и яровой тритикале

Семена родительских сортов тритикале высевали в вегетационные горшки по 10 семян на горшок в теплице Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Для яровизации озимые материнские растения при кущении помещали в яровизационную камеру на 60 дней, а затем возвращали в теплицу. Скрещивания проводили методом подстановок. Рекомбинантные инбредные линии получались путём пересева популяций в поле с контролем аллельного состояния с помощью молекулярных маркеров.

## 2.3 Полевой опыт

Полевой опыт по выращиванию рекомбинантных инбредных линий пшеницы (F<sub>3:4</sub>; F<sub>4:5</sub>) и тритикале (F<sub>4:5</sub>; F<sub>5:6</sub>) проводился в 2018 и 2019 годах на опытном участке РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва) (таблица 2).

Таблица 2. Климатические условия в Москве в момент проведения полевых испытаний

Месяц	Сумма осадков, мм		Норма, мм	Средняя температура, °С		Норма, °С
	2018	2019	10 лет	2018	2019	10 лет
Май	44	58	61	16,1	16,2	13,6
Июнь	54	55	78	17,2	19,6	17,3
Июль	85	64	84	20,3	16,7	19,7
Август	20	48	78	19,8	16,4	17,6

Данные по полевым оценкам фенотипического проявления линий и сортов коллекции мягкой пшеницы были получены и любезно предоставлены Беспаловой Л.А. (НЦЗ имени П.П. Лукьяненко)

## 2.4 Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из высушенных в лиофильной сушке листьев и из 4-х дневных проростков СТАВ методом (Rogers and Bendich, 1985).

## 2.5 Генотипирование

Для генотипирования растений по аллельным вариантам генов *TaGRF3*, использовали маркеры, разработанные нами в ходе работы и описанные в главе 3, для остальных генов используемые маркеры перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Молекулярные маркеры, используемые при определении аллельных вариантов генов *Ddw1*, *Rht-B1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Ppd-D1*

Ген	Маркер	Источник	Метод
<i>Ddw1</i>	REMS1218	Tenhola-Roininen, 2010	ПЦР, фрагментный анализ
	CAPS	Litvinov et al., 2020	ПЦР (эндонуклеазы рестрикции <i>Mnl 1</i> , <i>Rsa I</i> , <i>Bso31 I</i> )
<i>Rht1-B1p</i>	Rht-B1p-WF, Rht-B1p-F	Bazhenov et al., 2015	ПЦР
<i>Vrn-A1</i>	VRN1AF, VRN1- INTR1R, VRN1R	Yan et al., 2004	ПЦР
	Vrn-A1_9K0001	Rasheed, 2016; Khalid, 2019	KASP
<i>Vrn-B1</i>	Intr/B/F, Intr1/B/R4, Intr1/B/R3	Yan et al., 2004	ПЦР
<i>Ppd-D1</i>	Ppd-D1	Beales et al., 2007	ПЦР

## 2.6 Отбор растительного материала для секвенирования. SSR-анализ

Чтобы отобрать для секвенирования наиболее различающиеся сорта пшеницы по генам *TaGRF3* мы провели дополнительный отбор на разнообразие с использованием микросателлитных маркеров на 2D, 2B, 2A хромосомы.

## 2.7 Секвенирование

ПЦР-продукты, полученные при помощи подобранных нами субгеном-специфичных праймеров, после проверки их качества на электрофореze передавались для секвенирования по технологии Illumina в компанию «Геномед».

## 2.8 Полевое фенотипирование

Оценка хозяйственно-ценных признаков проводилась на 15 индивидуальных растениях тритикале и на 10 индивидуальных растениях пшеницы из каждой линии. Для коллекции пшеницы полевое фенотипирование проводили сотрудники НЦЗ имени П.П. Лукьяненко в Краснодаре.

## 2.9 Статистическая обработка

Однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ был выполнен с помощью программы Statistical12, проверку нулевой гипотезы проводили при помощи критерия Фишера. Парные сравнения были выполнены с помощью критерия Тьюки и доверительного интервала. Анализ проводился на 95% уровне доверительной вероятности.

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 3.1 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF3-2A*

### 3.1.1 Секвенирование гена *TaGRF3-2A*

Нами были подобраны специфичные праймеры для секвенирования гена *TaGRF3-2A* у 19 сортов пшеницы (Гром, Алтиго, Алексеич, Дока, L.2877k58, Аль-Муруж, Фишт, Ирак, Новосибирская 67, Протон, Роми, Саратовская 29, Сила, Стан, Томуз 3, Васса, Велена, Вид). В результате у пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) нами был идентифицирован 21 гаплотип гена *TaGRF3-2A* (TraesCS2A01G435100) и его окружения (область 5'-некодирующей области и промотора до -1075 нуклеотидов от старт-кодона, и 1389 нуклеотидов после стоп-кодона, включая 3'-нетранслируемую область и терминатор). Также у пшеницы спельты (*Triticum spelta* L.) PI 428198, дикой полбы *Zavitan* (*Triticum dicoccoides* (Koern. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf.) и пшеницы Урарту (*Triticum urartu* Thum. ex Gandil.), включённых в исследование для сравнения, было обнаружено ещё по одному гаплотипу отличному от мягкой пшеницы. При этом гаплотип *T. urartu* отличался от аллелей пшеницы мягкой по множеству уникальных однонуклеотидных вариантов, гаплотип дикой полбы имел меньшее количество отличий, а гаплотип спельты не имел уникальных точковых мутаций и отличался по совокупности высоко вариабельного SNP и длины микросателлита в 5'-UTR области.

### 3.1.2 Полиморфизмы гена *TaGRF3-2A*

В промоторе гена *TaGRF3-2A* нами был обнаружен часто встречающийся полиморфизм chr2A:g.687048627G>C (рисунок 1). У большинства сортов пшеницы

мягкой, а также у её диких сородичей, включённых в наше исследование, присутствует вариант «С», в то время как у сортов Chinese Spring, Jagger, Lancer, CDC Stanley, Norin 61 и Новосибирская 67 присутствует вариант «G». Вариант «Т» полиморфизма chr2A:g.687048382C>Т выявлен у сортов Гром и Алтиго. Вариант «Т» полиморфизма chr2A:g.687048137G>Т присутствует у сортов Велена и Парагон. Вариант «G» полиморфизма chr2A:g.687048328A>G наличествует в нашем исследовании только у других видов – *T. urartu* (PI428198) и *T. dicoccoides* (Zavitan). В рассматриваемой области промотора (chr2A:g.687047878\_687048697) в гаплотипе *T. urartu* нами было обнаружено 15 уникальных однонуклеотидных вариантов.

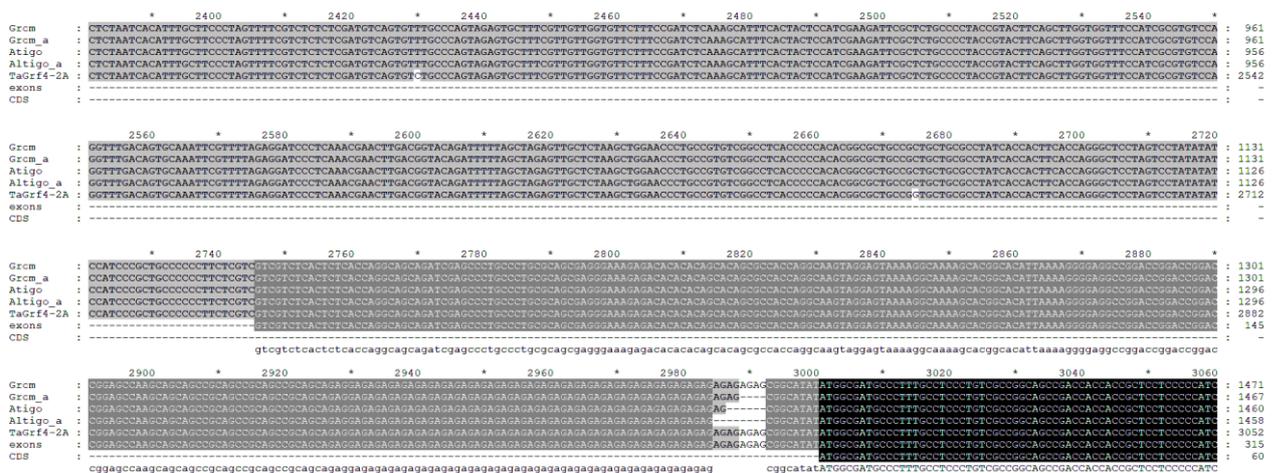


Рисунок 1. Часть промотора, 5'-нетранслируемая область и начало белок-кодирующей последовательности гена *TaGRF3-2A* у сортов Гром и Алтиго. Последовательности с добавленной буквой «\_a» получены после внесения полиморфизмов, обнаруженных программой freebayes в контиги, собранные программой SPAdes. Также дана референсная последовательность хромосомы 2A, экзонов гена (exons) и белок-кодирующей части гена (CSD)

В 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена *TaGRF3-2A* присутствует микросателлитный повтор (AG)<sub>n</sub>, где число повторов *n* варьирует от 11 до 37 (рисунок 2). Некоторые варианты микросателлита отличаются потерей одного нуклеотида А, давая в результате длину повтора не кратную двум – 55 и 61 нуклеотид. У полбы Zavitan на небольшом расстоянии перед микросателлитом обнаружена делеция 12 нуклеотидов с.-102\_-91del. Также у Zavitan в 5'-UTR имеется однонуклеотидная замена с.-140A>G.

В 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) у *T. urartu* PI 428198 присутствуют две однонуклеотидные замены с.\*285A>G и с.\*312A>T, а у пшеницы мягкой CDC Landmark присутствует однонуклеотидная замена с.\*8C>T.

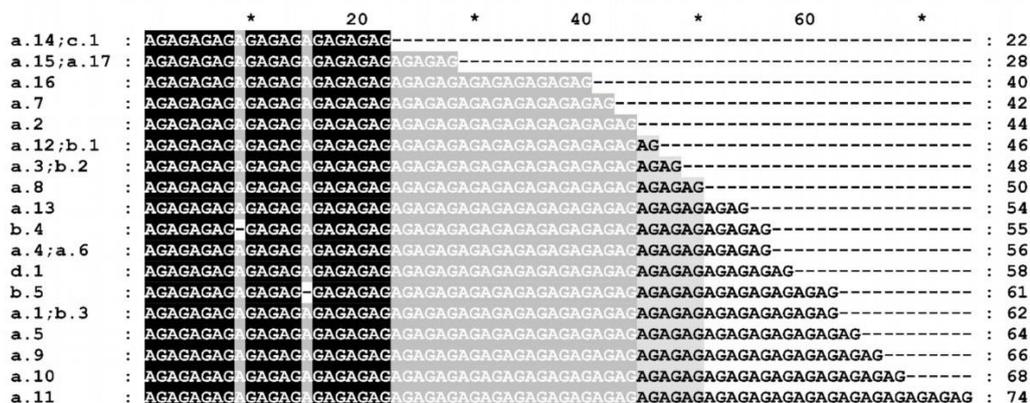


Рисунок 2. Изменения длины микросателлита в 5'-UTR гена *TaGRF3-2A*, обнаруженные с помощью секвенирования. Гаплотипы *TaGRF3-2A* указаны в начале каждой строки

В окружении гена с 3'-конца в непосредственной близости от точки окончания транскрипции у *T. urartu* PI 428198 присутствует однонуклеотидная замена chr2:g.687052487C>T, а у дикой полбы Zavitan в этом же локусе имеется делеция двух нуклеотидов chr2:g.687052487\_687052488del. У *T. urartu* в рассматриваемом участке хромосомы также имеется делеция одного нуклеотида chr2:g.687052671del.

В интронах гена отличия от референсной последовательности Chinese Spring IWGSCv1.0 присутствовали только у *T. urartu*. Во втором интроне у образца PI 428198 присутствовала инсерция трёх нуклеотидов с.325+32\_+33insTCC, а также 3 однонуклеотидных замены с.325+169G>C, с.326-39A>G, с.326-174A>G. В третьем интроне у этого же образца пшеницы присутствовали однонуклеотидные замены с.689+136A>G и с.689+241T>C.

В кодирующей части гена, во втором экзоне у сорта пшеницы мягкой Новосибирская 67 была обнаружена делеция 9 нуклеотидов с.126\_134del, приводящая к выпадению трёх остатков глутамина в молекуле белка в полиглутаминовом регионе p.(Gln42\_Gln44del). В третьем экзоне нами был найден весьма распространённый среди краснодарских сортов пшеницы полиморфизм с.495G>T, приводящий к замене аминокислотного остатка глутамина на гистидин p.(Gln165His). У *T. urartu* в том же экзоне присутствуют две соседствующие однонуклеотидные замены относительно

референсного генома пшеницы – с.528G>C и с.530C>G, которые приводят к замене двух последовательно идущих аминокислот в белке р.(Gln176\_Ala177delinsHisGly). В 4-ом экзоне, также у *T. urartu* присутствует замена с.729C>G, приводящая к изменению белка р.(Asp243Glu).

### 3.1.3 Маркеры на аллельные варианты гена *TaGRF3-2A*

Для детекции 9-нуклеотидной делеции во втором экзоне гена *TaGRF3-2A*, приводящей к делеции трёх остатков глутамина р.(Gln42\_Gln44del), найденной нами путём секвенирования у сорта Новосибирская 67, нами были подобраны специфичные праймеры GRF3-2A-Q42-F: 5'-СТТСТАТСТГТАГСТСГАГГТГТ-3' и GRF3-2A-Q42-R: 5'-GTGGTAGGAGGAGGAGGAАТСТА-3'..

У сорта Новосибирская 67 в результате ПЦР данная пара праймеров должна давать фрагмент размером 335 п.н., а у остальных сортов пшеницы – 344 п.н. (рисунок 3).

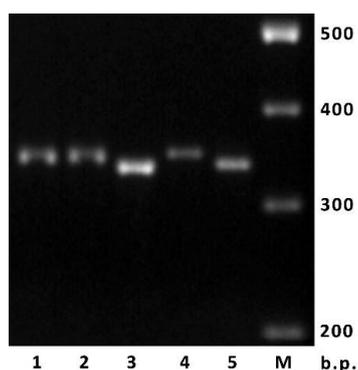


Рисунок 3. Пример амплификации маркера *GRF-2A-Q41*. Расшифровка 1-Вид, 2-Стан, 4-Алтиго, 3 и 5-Новосибирская 67, М- маркер молекулярного веса «Синтол-100 п.н.»

Для детекции полиморфизма с.495G>Т, приводящего к изменению белка р.(Gln165His), нами были подобраны праймеры GRF3-2A-Q165-F: 5'-GGGTTTTCTТААТТТГСТТGCAGT-3' и GRF3-2A-Q165-R: 5'-CAGAAGATAAAAACGGCAGGTGA-3' и эндонуклеаза рестрикции SfaN I. В результате ПЦР с данными праймерами получается продукт размером 454 п.н. При наличии нуклеотида Т в позиции с.495 гена *TaGRF3-2A* ПЦР-продукт будет иметь сайт рестрикции SfaN I (GCATC(5/9)^) и разрежется на 2 фрагмента размером примерно 201 и 253 п.н. с липкими концами, а при наличии нуклеотида G сайт рестрикции отсутствует (рисунок 4).

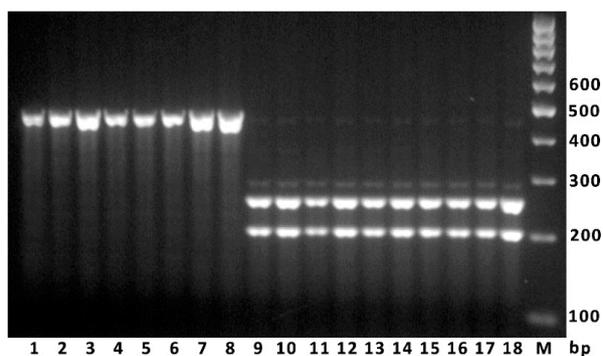


Рисунок 4. Пример электрофореза ПЦР продукта маркера GRF-2A-Q165 после обработки эндонуклеазой рестрикции SfaN I. Дорожки 1–8 образцы с аллелем *TaGRF3-2Aa* (две дорожки для каждого): Гром, Алтиго, Велена, Сила; дорожки 9–18 образцы с аллелем *TaGRF3-2Ab* (две дорожки для каждого): Васса, Протон, Алексеич, Вид, Стан. М – маркер молекулярного веса «Синтол-100 п.н.»

### 3.1.4 Эффекты аллелей гена *TaGRF3-2A* на хозяйственно-ценные признаки в коллекции пшеницы

Для обнаружения 9-нуклеотидной делеции во втором экзоне гена *TaGRF3-2A*, идентифицированной нами у сорта Новосибирская 67, был использован маркер GRF-2A-Q41. Скрининг 199 образцов мягкой пшеницы из коллекции Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко показал, что среди них был только аллель *TaGRF3-2Aa*. Это свидетельствует о том, что сорт Новосибирская 67 несёт редкую мутацию гена *TaGRF3-2A*. Мы обозначили эту мутацию как *TaGRF3-2Ad*, соответствующую изоформе белка D.

Для обнаружения мутации с.495G>T, приводящей к аминокислотной замене, мы использовали маркер GRF-2A-Q165. При анализе пула из 199 образцов мягкой пшеницы с использованием этого маркера мы обнаружили, что вариант «Т» полиморфизма с.495G>T, присущий аллелю *TaGRF3-2Ab*, обнаружен почти у 39% образцов. Статистический анализ фенотипических данных образцов озимой мягкой пшеницы, собранных за три года (2018–2020 гг.) в Краснодаре, показал, что аллель *TaGRF3-2Ab* (вариант «Т» при полиморфизме с.495G>T) в каждый из трёх лет достоверно ассоциировался с более ранним колошением ( $p=0,02$ , F-критерий Фишера) и более высокой массой зерна ( $p=0,01$ ) по сравнению с аллелем *TaGRF3-2Aa* (рисунок 5).

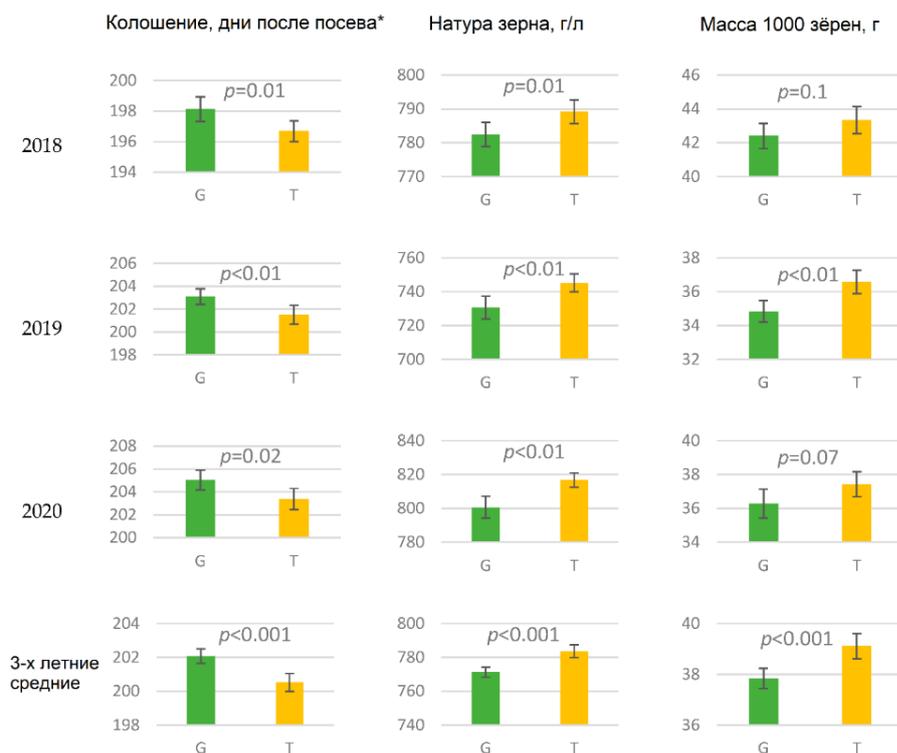


Рисунок 5. Сроки колошения, масса 1000 зёрен и натура зерна образцов озимой пшеницы, отличающихся мутацией с.495G>Т в *TaGRF3-2A*, испытанных в 2018–2020 гг. в Краснодаре. Столбцы указывают 95% доверительные интервалы. Значения *p* рассчитывались для F-критерия Фишера (Vazhenov et al., 2021)

Через год выявлена положительная ассоциация аллеля *TaGRF3-2Ab* с массой 1000 зёрен (2019 г.,  $p < 0,01$ ) и высоким содержанием белка в зерне (2018 г.,  $p = 0,01$ ). Однако в 2018 г. урожайность зерна была значительно ниже у образцов озимой пшеницы с аллелем *TaGRF3-2Ab*, что предположительно было связано с более низким числом зёрен в колосе или числа побегов растения. Однако выход белка на гектар незначительно снизился у образцов, несущих *TaGRF3-2Ab* в 2018 г.

Было обнаружено 9 вариантов размера микросателлитного локуса в 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена *TaGRF3-2A* в образцах коллекции пшеницы с использованием маркера GRF-SSR-2A, хотя сравнение микросателлита 5'-UTR среди секвенированных гаплотипов *TaGRF3-2A* дало 18 различных длин tandemных повторов *TaGRF3-2A*. Это можно объяснить тем, что были секвенированы и генотипированы разные образцы. Статистический анализ показал значимую связь между микросателлитным маркером и агрономическими признаками.

Выявлена значимая связь со временем колошения, высотой растений, натурой зерна, массой 1000 зёрен и визуальной оценкой выполненности зерна для

микросателлитного маркера GRF-SSR-2A, локализованного в 5'-нетранслируемой области гена *TaGRF3-2A*. Наиболее рано вступали в фазу колошения линии и сорта пшеницы с вариантом микросателлита 283 п.н. Значимо по высоте отличались образцы пшеницы с вариантами 258, 270 и 277 п.н. (средние, низкие и высокие соответственно). Низкой натурой и выполненностью зерна отличались образцы с вариантом маркера 266 п.н., однако масса 1000 зёрен у этих же образцов была больше среднего (большое по размеру, слабо выполненное зерно).

### **3.1.5 Эффекты аллелей гена *TaGRF3-2A* в присутствии *Rht-B1p* на хозяйственно-ценные признаки рекомбинантных инбредных линиях пшеницы (полученные в результате скрещивания образцов *Chris Mutant* x Новосибирская 67)**

**Элементы продуктивности.** При наличии аллеля *TaGRF3-2Aa(339)* у растений пшеницы в 2019 году увеличилось число колосков в колосе на 4% ( $p \leq 0,05$ ). Для 2018 года было отмечено увеличение массы 1000 зёрен при наличии у растений пшеницы аллеля *TaGRF3-2Aa(339)* на 1,6 г (5%) ( $p \leq 0,05$ ). Аллель *Rht-B1p* привёл к снижению массы 1000 зёрен на 5,5 г (17%) в 2018 году и 1,6 г (4%) в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). Число зёрен уменьшилось на 2,5 шт (7%) (только в 2018 г), масса зерна с колоса на 0,3 г (22%) (только в 2018 год) ( $p \leq 0,05$ ). Уборочный индекс (Кхоз) был выше у растений при одновременном наличии *Rht-B1p* и *TaGRF3-2Ad(330)*, а при наличии *Rht-B1a* у растений Кхоз был выше в сочетании с другим аллелем – *TaGRF3-2Aa(339)*.

**Сроки развития.** В 2018 году в среднем все генотипы выколашивались и цвели позднее, чем в 2019 году. Разница между короткостебельными растениями *TaGRF3-2Ad(330)* и *TaGRF3-2Aa(339)* составила 1 день в числе дней от посева до колошения в сторону увеличения этого признака у первого аллеля в 2018 г. ( $p \leq 0,05$ ), а в 2019 г. было увеличение в сторону второго аллеля.

**Габитус растений.** Аллель гена *TaGRF3-2Ad(330)* снизил высоту на 4,8 см (6%). При проведении двухлетних полевых испытаний на пшенице было показано, что аллель *Rht-B1p* достоверно снижал высоту растений на 21,3—25,6 см (29—30%) ( $p \leq 0,05$ ).

## **3.2 Разработка нового CAPS маркера для определения аллельных вариантов гена *Ddw1***

Единственным методом способным достоверно определить аллельное состояние гена короткостебельности *Ddw1* на сегодняшний день является дорогостоящий метод

фрагментного анализа. Мы разработали CAPS маркер, сделав идентификацию аллельных вариантов гена *Ddw1* более доступной. С использованием праймеров на микросателлитную последовательность *gems1218* (сцепленную с геном *Ddw1*) и трёх эндонуклеаз рестрикции, *Mnl I*, *Rsa I* и *Bso31 I*, можно достоверно идентифицировать генотип *Ddw1*, а также выявлять гетерозиготу. Данный маркер был использован нами при генотипировании тритикале.

### **3.3 Эффекты аллелей гена *TaGRF3-2A* в присутствии *Ddw1* на хозяйственно-ценные признаки рекомбинантных инбредных линиях тритикале (полученные в результате скрещивания сортов Хонгор х Дублет)**

**Элементы продуктивности.** Аллель *TaGRF3-2A(274)* привёл к увеличению длины колоса на 5% и числа колосков в колосе 2% ( $p \leq 0,05$ ). Аллель *Ddw1* привёл к: уменьшению числа колосков в колосе на 3% в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ), уменьшению массы зерна с главного колоса на 0,4 г (19%) в 2018 году, на 0,2 г (10%) в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ), масса 1000 зёрен снизилась на 6,9 г (17%) в 2018 году, на 5,4 г (10%) в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). У растений тритикале с генотипом *Ddw1/TaGRF3-2A(274)* было достоверно больше число зёрен, чем у *Ddw1/TaGRF3-2A(262)* на 7 шт (14%) в 2018 году ( $p \leq 0,05$ ), на 3 шт (6%) в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). Масса зерна с главного колоса также была выше для генотипа *Ddw1/TaGRF3-2A(274)*, чем у *Ddw1/TaGRF3-2A(262)* на 0,4 г (26%) (2018 год) и 0,3 г (13%) (2019 год) ( $p \leq 0,05$ ), и была близка к массе зерна с колоса у растений с аллелем *ddw1*. Аллель *TaGRF3-2A(262)* способствовал увеличению уборочного индекса (Кхоз) на 3% ( $p \leq 0,05$ ) в 2018 году. В 2019 году для короткостебельных растений тритикале (*Ddw1*) Кхоз увеличился на 9% ( $p \leq 0,05$ ).

**Сроки развития.** Аллель *TaGRF3-2A(274)* способствовал сокращению сроков от посева до колошения и цветения на 2 дня в 2018 году ( $p \leq 0,05$ ) и на 3 дня в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). При наличии аллеля *Ddw1* у растений тритикале произошло увеличение количества дней от посева до колошения и цветения на 5 дней в 2018 ( $p \leq 0,05$ ) году и на 3 дня в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). Для короткостебельных растений (*Ddw1*) при аллельном варианте *TaGRF3-2A(274)* колошение наступало на 5 дней ( $p \leq 0,05$ ) и 7 дней ( $p \leq 0,05$ ) раньше в 2018 и 2019 году, соответственно, в сравнении с аллелем *TaGRF3-2A(262)*. Раньше вступали в фазу цветения растения с аллелем *TaGRF3-2A(274)*: на 5 и 7 дней, для 2018 и 2019 года соответственно ( $p \leq 0,05$ ).

**Габитус растений.** Для аллеля *TaGRF3-2A(262)* было отмечено снижение высоты растений тритикале на 3,7 см (5%) не зависимо от аллельного состояния *Ddw1* ( $p \leq 0,05$ ), для 2019 года эффект был менее выражен, но имел то же направление. В среднем за оба года испытания *Ddw1* снижал высоту растений яровой тритикале на 28,2 см (33%) ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.4 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF3-2B***

#### **3.4.1 Секвенирование гена *TaGRF3-2B***

Мы подобрали специфичные праймеры, провели амплификацию и секвенирование последовательности гена у 11 сортов мягкой пшеницы: Гром, Алтиго, Протон, Дока, Сила, Стан, Фишт. Частично ген *TaGRF3-2B* был секвенирован у сортов пшеницы Роми, Старшина, Ирак и Аль-Муруж.

#### **3.4.2 Полиморфизмы гена *TaGRF3-2B***

У секвенированных образцов пшеницы нами было обнаружено 5 вариантов промотора гена *TaGRF3-2B* (рисунок 6). Первый вариант (I) – у сортов пшеницы Гром, Протон, Дока, Сила, Аль-Муруж, Фишт и Старшина – не отличался от референсной последовательности сорта Chinese Spring. Второй вариант (II) – у сорта Алтиго – обнаружена 4-нуклеотидная делеция на расстоянии 176...179 оснований по референсной последовательности до старт-кодона и однонуклеотидный полиморфизм G-729C. Третий вариант (III) – у сорта Ирак – отличался по 9 однонуклеотидным полиморфизмам на расстоянии 522...1120 нуклеотидов до старт-кодона, а также полиморфизмом C-55T в 5'-нетранслируемой области. Четвертый вариант (IV) – у сортов Вид, Стан и Роми – наиболее существенно отличался от остальных. В нём наблюдалось более 37 однонуклеотидных полиморфизмов, делеция около 50 нуклеотидов с заменой их на новые 26 нуклеотидов на расстоянии примерно 320...376 перед старт-кодоном, инсерция 27 нуклеотидов между основаниями 1001 и 1002 перед старт-кодоном по референсной последовательности. Пятый вариант (V) промотора был схож с четвёртым и отличался от него по 2 SNP – T-276C и T-293C и был обнаружен у сорта Стан у одного из растений в гетерозиготном состоянии.



Связи аллельных вариантов гена *TaGRF3-2B* с фенотипическими признаками пшеницы обнаружено не было.

### 3.5 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF3-2D*

#### 3.5.1 Секвенирование гена *TaGRF3-2D*

Последовательность гена была секвенирована у 18 сортов пшеницы: Гром, Алтиго, Алексеич, Дока, L.2877k58, Аль-Муруж, Фишт, Ирак, Новосибирская 67, Протон, Роми, Саратовская 29, Сила, Стан, Томуз 3, Васса, Велена и Вид. Также в исследование был включен один образец *Aegilops tauschii* ssp. *tauschii* (K-896). Амплификацию проводили с помощью подобранных нами субгеном-специфичных праймеров.

#### 3.5.2 Полиморфизмы гена *TaGRF3-2D*

Последовательность гена *TaGRF3-2D* оказалась высоко консервативной среди данных образцов пшеницы. Полиморфизм в изучаемой группе сортов был обнаружен лишь в виде делеции 12 нуклеотидов (двух повторов GCAGCC) в микросателлите в 5'-нетранслируемой области гена (рисунок 8). Остальная часть гена и его промотор были идентичны у всех 18 сортов пшеницы. Делеция двух повторов GCAGCC была обнаружена у сортов Алексеич, Алтиго, Дока и L.2877k58.

	*	1280	*	1300	*	1320	*	1340	*
Alekseich	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	-----	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1338		
Altigo	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	-----	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1338		
Doka	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	-----	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1338		
Soberbash	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	-----	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1338		
Al_Murooj	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Fisht	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Grom	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Irak	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Novosibirskaya67	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Proton	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Romy	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Saratovskaya29	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Sila	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Stan	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Tcmuz3	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Vassa	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Velena	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
Vid	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
CS_TaGrf3_2D	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	1350		
exons	:	GCAGCAGCCGCGAGCC	GCAGCCGCGAGCC	GCAGCAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCGGGCATA	TATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	233		
CDS	:	-----	-----	-----	ATGGCGATGCCCTTTGCSTCCCTGTGCGCGGCA	:	33		

Рисунок 8. Полиморфизм в 5'-нетранслируемой области гена *TaGRF3-2D* у 18 сортов пшеницы

В самой последовательности гена *TaGRF3-2D* у *Aegilops tauschii* не было найдено отличий от референсного генома мягкой пшеницы Chinese Spring, но были обнаружены

два однонуклеотидных полиморфизма в промоторе гена – А(-476)G и С(-598)Т. Полиморфизм С(-598)Т приводит к тому, что у пшеницы в промоторе гена *TaGRF3-2D* присутствует сайт связывания транскрипционных факторов семейства AP2/ERF, а полиморфизм А(-476)G – к появлению сайтов связывания транскрипционных факторов семейств В3 и SBP, которые отсутствуют у *Aegilops tauschii*. У *Aegilops tauschii* в промоторе гена присутствуют дополнительные сайты связывания транскрипционных факторов В1НD1.

### **3.5.3 Разработка маркера на аллельные варианты гена *TaGRF3-2D***

Мы разработали маркер GRF-2D-SSR, выбрав праймеры, которые обнаруживают выявленную вставку/делецию в 5'-UTR гена *TaGRF3-2D*. В результате проверки полученного маркера GRF-2D-SSR на 18 сортах пшеницы мы показали, что у сортов Алексеич, Алтиго, Дока и L.2877k58 амплифицируется фрагмент 238 п.н., у остальных сортов – фрагмент 250 п.н., что соответствует данным секвенирования. Среди коллекции пшеницы также выявлено только два типа фрагментов: 238 п.н. у 26 сортов, и 250 п.н. у 53 сортов.

### **3.5.4 Эффекты аллелей гена *TaGRF3-2D* на хозяйственно-ценные признаки пшеницы**

Мы оценили связь между аллельным состоянием гена *TaGRF3-2D* и массой и размером зерна в наборе из 20 селекционных линий мягкой озимой пшеницы (Полевая станция РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева). Установлено, что линии с 5'-UTR-238 имеют более высокие значения массы тысячи зёрен ( $p=0,029$ ) и длины зерна ( $p=0,022$ ) по сравнению с линиями с 5'-UTR-250.

### **3.5.5 Изучение коллекции *Aegilops tauschii* на аллельное состояние гена *TaGRF3-2D***

Разработанный нами маркер GRF-2D-SSR был использован для скрининга коллекции *Ae. tauschii*. В результате было выявлено два типа фрагментов. Идентифицированные аллельные варианты 5'-UTR были обозначены как 5'-UTR-244 и 5'-UTR-250. Фрагмент длиной 244 п.н. был обнаружен у 20 образцов *Ae. tauschii* ssp. *tauschii*, у одного ssp. *tauschii* var. *meyeri*, одного var. *anathera*, и двух var. *typica* а также трёх *Ae. tauschii* ssp. *strangulata*; фрагмент длиной 250 п.н. обнаружен у трёх *Ae. tauschii* ssp. *tauschii*, одного *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* var. *typica* и у шести *Ae. tauschii* ssp. *strangulata*. Среди коллекции *Ae. tauschii* не было выявлено аллельного варианта 5'UTR-238, обнаруженного у пшеницы.

### 3.5.6 Создание SSR маркера для мультиплексной ПЦП на полиморфизм генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D*

Для одновременной детекции полиморфизмов в 5'-нетранслируемой области генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D* нами был разработан мультиплексный маркер. Амплификацию проводили в двух комбинациях маркеров, одна из которых давала амплификацию фрагментов для А и D геномов (*GRF-2AD-SSR-F* + *GRF-2AD-SSR-R FAM*), вторая для В генома (*GRF-2AD-SSR-R FAM* + *GRF-2B-SSR-F*) (рисунок 9).

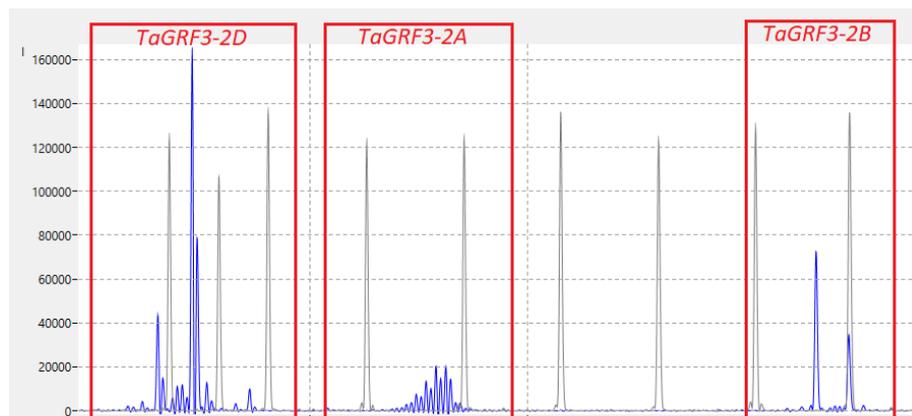


Рисунок 9. Пример фрагментного анализа с использованием маркеров *GRF-2B-SSR-F* + *GRF-2AD-SSR-R FAM* + *GRF-2AD-SSR-F*

## 3.6 Анализ взаимодействия аллелей генов короткостебельности и генов-регуляторов роста и развития

### 3.6.1 Взаимодействие аллелей генов *Rht-B1* и *Ddw1* у тритикале (рекомбинантные инбредные линии, полученные в результате скрещивания между сортами Мудрец × Дублет и, полученные в результате скрещивания между сортами Валентин 90 × Дублет)

**Элементы продуктивности.** Влияние генов короткостебельности на число зёрен в главном колосе в обеих популяциях показало сходные тенденции: в группе растений с генотипом *ddw1/Rht-B1b* число зёрен в колосе было несколько выше, а в группе растений с генотипом *Ddw1/Rht-B1a* оно было немного ниже, чем у *ddw1/Rht-B1a*. Также было продемонстрировано, что *Rht-B1b* значительно увеличивал количество зёрен в колосе в популяции Мудрец × Дублет на 0,29 шт. (18,96%). Масса 1000 зёрен уменьшилась в обеих популяциях при наличии аллеля *Ddw1*. В популяции Мудрец × Дублет аллель *Ddw1* снижал массу 1000 зёрен на 9,9 г (21,5%) и вместе с *Rht-B1b* на 8,4 г (18,2%).

**Сроки развития.** Растения с аллелями *Ddw1/Rht-B1a* колосились на 5 дней позже, чем растения с *ddw1/Rht-B1a* в популяции Мудрец × Дублет.

**Габитус растений.** В популяции Валентин 90 × Дублет действие *Rht-B1b* оказало значительное влияние и уменьшило высоту растений на 11,2 см (9,4%). В то же время *Ddw1* достоверно уменьшал рост на 38,9 см (37,2%) в популяции Мудрец × Дублет и на 35,8 см (30,2%) в популяции Валентин 90 × Дублет. Для растений с генотипом *Ddw1/Rht-B1b*, никакого дополнительного влияния на уменьшение высоты обнаружено не было.

### **3.6.2.1 Взаимодействие аллелей генов *Rht-B1* и *Vrn-B1* у пшеницы (рекомбинантные инбредные линии, полученные в результате скрещивания между образцами Chris Mutant x Новосибирская 67)**

**Элементы продуктивности.** В сочетании с аллелем *vrn-B1* у высокорослых растений было 14,8 шт колосков (2018 год), а для 2019 года наибольшее число колосков было у таких растений с аллелем *Vrn-B1a* – 16 шт. Масса 1000 зёрен достоверно отличалась у высокорослых растений и была больше при аллельном варианте с *Vrn-B1a* на 1,8 г (5%), по сравнению с такими растениями при *vrn-B1* в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). Кхоз был выше у растений с генотипом *Rht-B1p/Vrn-B1a* на 8% (2018 год) и на 3% (2019 год) по сравнению с *Rht-B1p/vrn-B1* ( $p \leq 0,05$ ).

**Сроки развития.** Растения с генотипом *Rht-B1p/vrn-B1* и *Rht-B1a/Vrn-B1a* отличались в наступлении фазы цветения в 3 и 4 дня для 2018 и 2019 года соответственно (в сторону увеличения этого периода для первой группы) ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.6.2.2 Взаимодействие аллелей генов *Rht-B1* и *Ppd-D1* у пшеницы (рекомбинантные инбредные линии, полученные в результате скрещивания между образцами Chris Mutant x Новосибирская 67)**

**Элементы продуктивности.** Число зёрен у короткостебельных растений было сравнимо с высокорослыми растениями при наличии аллеля *Ppd-D1b*: *Rht-B1p/Ppd-D1b* 38 шт (2018 год) против *Rht-B1a/Ppd-D1b* 38 шт (2018 год) против *Rht-B1a/Ppd-D1a* 35 шт (2018 год). Увеличилась масса зерна с главного колоса на 0,2 г (12%) в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ) у растений с генотипом *Rht-B1p/Ppd-D1b*. Масса 1000 зёрен была больше у растений при наличии *Rht-B1a* для двух лет полевых испытаний. В 2018 году наибольшая масса 1000 зёрен была у растений с генотипом *Rht-B1a/Ppd-D1a* 32,9 г, а в 2019 у *Rht-B1a/Ppd-D1b* 39,7 г. Для короткостебельных растений с разными аллелями

*Ppd-D1* достоверно больше Кхоз был для растений с *Ppd-D1b* на 2,5% ( $p \leq 0,05$ ), в сравнении с *Ppd-D1a* в 2019 году, в 2018 году наблюдалась обратная ситуация для аллелей *Ppd-D1* при наличии *Rht-B1p*.

**Сроки развития.** Растения с аллелем *Ppd-D1a* имели более ранние сроки колошения и цветения (разница в 4 дня с противоположным аллелем ( $p \leq 0,05$ )). Растения с генотипом *Rht-B1p/Ppd-D1a* выколашивались раньше на 3 дня, чем *Rht-B1p/Ppd-D1b* в 2018 году и на 4 дня в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). В 2019 году на 5 дней наступало раньше цветение у растений с *Rht-B1p/Ppd-D1a* по сравнению с *Rht-B1p/Ppd-D1b*, для 2018 года разница была 3 дня в ту же сторону ( $p \leq 0,05$ ).

**Габитус растений.** Аллель *Ppd-D1a* приводил к уменьшению высоты растений пшеницы на 4,3 см (7%) ( $p \leq 0,05$ ). Самые низкорослые растения с высотой 52,3 см (2018 год) и 59,7 см (2019 год) были с генотипом *Rht-B1p/Ppd-D1a*.

### **3.6.3 Взаимодействие аллелей генов *Ddw1* и *Vrn-A1* у тритикале (рекомбинантные инбредные линии, полученные в результате скрещивания между сортами Хонгор х Дублет)**

**Элементы продуктивности.** При *Ddw1* масса зерна главного колоса была выше в совокупности с *Vrn-A1a* в 2018 году, а в 2019 году с *Vrn-A1b*, также как и число зёрен и масса 1000 зёрен. Основные отличия были между группами генотипов с разными аллельными вариантами *Ddw1*.

**Сроки развития.** Растения тритикале при аллельном варианте *Vrn-A1a* достоверно раньше колосились и цвели в 2018 году на 3 и 4 дня ( $p \leq 0,05$ ), а в 2019 году разница составила 2 дня ( $p \leq 0,05$ ). У короткостебельных растений (*Ddw1*) при наличии *Vrn-A1a* колошение наступало на 7 дней раньше в 2018 году ( $p \leq 0,05$ ), на 3 дня раньше в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ). Цветение у короткостебельных форм (*Ddw1*) при наличии *Vrn-A1a* наступало на 8 дней раньше в 2018 году ( $p \leq 0,05$ ) и на 3 дня раньше в 2019 году ( $p \leq 0,05$ ).

**Габитус растения.** Для 2019 года можно отметить, как для высокорослых (*ddw1*), так и для низкорослых (*Ddw1*) растений при наличии аллеля *Vrn-A1b* высота растений тритикале была ниже. Разница между генотипами *ddw1/Vrn-A1b* и *ddw1/Vrn-A1a* составила 7,1 см (8%) ( $p \leq 0,05$ ), а для *Ddw1/Vrn-A1b* и *Ddw1/Vrn-A1a* составила 1,5 см (2%) ( $p \geq 0,05$ ), в сторону уменьшения высоты для генотипов с *Vrn-A1b*.

## ВЫВОДЫ:

1. Секвенированы нуклеотидные последовательности функциональных генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* и *TaGRF3-2D*, включая 5'- и 3'-нетранслируемые и промоторные области, у набора фенотипически различающихся образцов пшеницы. Наиболее полиморфными оказались 5'-нетранслируемая и промоторная области изучаемых генов.
2. На основании выявленных полиморфизмов был создан набор молекулярных маркеров, позволяющий идентифицировать аллельные варианты генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B* (у пшеницы и тритикале) и *TaGRF3-2D* (только у пшеницы), в том числе мультиплексный маркер для идентификации аллельных вариантов всех трёх изучаемых генов одновременно. Созданные маркеры могут быть использованы в селекции пшеницы и тритикале.
3. В коллекции 37 образцов *Ae. tauschii* ssp. *tauschii*, *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* var. *meyeri*, *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* var. *typica* и *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* были выявлены аллельные варианты гена *TaGRF3-2D* 5'-UTR-244 и 5'-UTR-250, в то время как у мягкой пшеницы – варианты 5'-UTR-238 и 5'-UTR-250. Таким образом, аллель 5'-UTR-238 мог возникнуть в ходе эволюционных процессов внутри генома гексаплоидной пшеницы, а 5'-UTR-250 был перенесён в пшеницу из *Ae. tauschii*.
4. Аллельное состояние генов *TaGRF3-2A* и *TaGRF3-2D* у пшеницы влияет на признаки продуктивности. Аллель *TaGRF3-2Ab* увеличивает урожайность зерна, сокращает сроки колошения, улучшает натуру зерна, увеличивает массу 1000 зёрен и содержание белка в зерне, по сравнению с *TaGRF3-2Aa*. Аллель 5'-UTR-238 гена *TaGRF3-2D* увеличивает массу и длину зерновки, в сравнении с 5'-UTR-250. Аллельные варианты гена *TaGRF3-2B* не влияют на признаки растений.
5. В полевых опытах в условиях Московской области (Центральный регион Нечернозёмной зоны) на рекомбинантных инбредных линиях гексаплоидной тритикале было показано статистически значимое влияние аллельного состояния гена *TaGRF3-2A* в присутствии гена короткостебельности *Ddw1* на признаки растений. Аллель *TaGRF3-2A(274)* увеличивает массу зерна с главного колоса, массу 1000 зёрен, сокращает время цветения и колошения.

6. Негативные эффекты как гиббереллин-чувствительных, так и гиббереллин-нечувствительных генов короткостебельности могут быть компенсированы правильным подбором аллельных вариантов генов-компенсаторов *TaGRF3-2A*, *Vrn-A1*, *Rht-B1* и *Ppd-D1* у пшеницы и гексаплоидной тритикале.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК и/или входящих в перечень Web of Science/Scopus:**

1. Chernook A.G., Kroupin P.Yu., Karlov G.I., Divashuk M.G., Soloviev A.A., Korshunova A.D., Rubets V.S., Igonin V.N. Effects of *Rht-B1b* and *Ddw1* dwarfing genes in two connecting populations of spring triticale under greenhouse experiment conditions/ A.G. Chernook et al.// Agriculture. – 2019. – Т. 9. – № 6. – P. 119.
2. Chernook A. G., Bazhenov M. S., Kroupin P. Yu., Ermolaev A. S., Kroupina A. Yu., Vukovic M., Avdeev S. M., Karlov G. I., Divashuk M. G. Compensatory effect of the *ScGrf3-2R* gene in semi-dwarf spring triticale (x *Triticosecale* Wittmack)/ A.G. Chernook et al. // Plants. –2022. –Т. 11. –№22. –P. 3032.
3. Крупин П.Ю., Черноок А.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А., Коршунова А.Д., Дивашук М.Г. Изучение эффекта генов короткостебельности пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ржи (*Secale cereale* L.) на примере расщепляющейся популяции яровой тритикале в условиях вегетационного опыта/ П.Ю. Крупин и др.// Сельскохозяйственная биология. – 2019. –Т. 54. –№ 5. –С. 920-933.
4. Bazhenov M.S., Chernook A.G., Karlov G.I., Nazarova L.A., Divashuk M.G., Bepalova L.A., Gritsay T.I., Polevikova N.A. Alleles of the *GRF3-2A* gene in wheat and their agronomic value/ M.S. Bazhenov et al. //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – № 22. – P. 12376.
5. Divashuk M.G., Chernook A.G., Kroupina A.Yu., Vukovic M., Karlov G.I., Ermolaev A.S., Shirnin S.Yu., Igonin V.N., Kroupin P.Yu., Avdeev S.M., Pylnev V.V. *TaGRF3-2A* improves some agronomically valuable traits in semi-dwarf spring triticale/ M. G. Divashuk et al. //Plants. –2021. – Т. 10. – № 10. –P.2012.
6. Kroupin P.Yu., Chernook A.G., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Divashuk M.G., Goncharov N.P., Chikida N.N. Allele mining of *TaGRF-2D* gene 5'-utr in *Triticum aestivum* and *Aegilops tauschii* genotypes/ P.Yu. Kroupin et al. //PLoS ONE. – 2020. – Т. 15. – № 4. – P. e0231704.

7. Litvinov D.Y., Chernook A.G., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Divashuk M.G., Avdeev S.M. A convenient co-dominant marker for height-reducing *Ddw1* allele useful for marker-assisted selection/ D.Y. Litvinov et al.// Agriculture. – 2020. – T.10. – № 4. – P. 110.
8. Kroupin P.Yu., Chernook A.G., Karlov G.I., Divashuk M.G., Soloviev A.A. Effect of dwarfing gene *Ddw1* on height and agronomic traits in spring triticale in greenhouse and field experiments in a non-black earth region of Russia/ P.Yu. Kroupin et al.// Plants. – 2019. – T. 8. – № 5. – P. 131.