

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФГБНУ ВНИИСБ)

На правах рукописи

Мохов Тимофей Дмитриевич

ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ
АЗОТНОГО ОБМЕНА И ИХ ВКЛАД В ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ
ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ

Специальность: 1.5.7 – генетика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
Кочешкова Алина Александровна

Оглавление

Оглавление	2
Введение	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Источники азота и пути поступления	16
1.1.1 Ассимиляция азота. Ключевые ферменты	19
Нитрит-редуктаза (NIR)	20
Глутаминсинтетаза (GS)	21
Глутаматсинтетаза (GOGAT)	21
Нецентральные ферменты.	21
Глутаматдегидрогеназа (GDH)	21
Аланин-аминотрансфераза (AlaAT):	22
Аспарагинсинтетаза (AsnS)	23
1.1.2 Метаболические пулы азота и ремобилизация	23
1.2 Генетическая архитектура признаков эффективности использования азота	26
1.2.1 Количественные локусы (QTL) эффективности использования азота у пшеницы и других злаков	26
1.2.2 Гены транспортеров аммония (AMT)	28
1.2.3 Гены транспортеров нитратов (NRT/NPF)	29
1.2.4 Гены глутаминсинтетазы (GS)	30
1.2.5 Гены глутаматсинтазы (GOGAT)	32
1.2.6 Гены аспарагинсинтетазы (ASN) и аланинаминотрансферазы (AlaAT)	33
1.3 Молекулярно-генетические механизмы регуляции азотного обмена	35
1.3.1 Узнавание нитрата: роль NRT1.1/NRT1.1B и NLP-факторов	35
1.3.2 Интеграция углеродного и азотного сигналов: TOR, SnRK1, Tre6P	38
1.3.3 Гормональная регуляция азотного ответа (ауксины, цитокинины, гиббереллины, АБК)	39
1.3.4 Эпигенетическая регуляция (метилирование ДНК, гистоновые модификации)	41
1.4 Гены, интегрирующие азотный обмен и архитектуру растения	43
1.4.1 DELLA-белки и их влияние на эффективность азотного обмена	43

1.4.2 Транскрипционные факторы GRF (Growth-Regulating Factors): регуляция роста и компенсация негативных эффектов короткостебельности	43
1.4.3 Ген <i>NGR5</i> как интегратор гиббереллиновой сигнализации и азотного метаболизма	44
1.4.4 Другие регуляторы (семейства GRAS, AP2/EREBP).....	45
1.5 Генетические ресурсы и современные подходы для селекции злаков с высокой азотной эффективностью	46
1.5.1 Дикие сородичи и местные сорта как источники аллелей для улучшения NUE	46
1.5.2 Высокопроизводительное фенотипирование и генотипирование	47
1.5.3 Полногеномный ассоциативный анализ (GWAS) и мета-анализ QTL	47
1.5.4 Мультиомиксные подходы и редактирование генома.....	48
1.5.5 Геномная селекция и маркер-ориентированная селекция (MAS)	49
1.6 Сравнительная геномика злаков в контексте азотного обмена.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Растительный материал	52
2.1.1 Коллекция мягкой пшеницы.....	52
2.1.2 Рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы и яровой тритикале.....	54
2.2 Выделение ДНК.....	54
2.3 Подбор праймеров для амплификации и секвенирования генов	56
2.4 NGS-секвенирование ампликонов	58
2.5 Картирование прочтений и выявление полиморфизмов	59
2.6 Фенотипирование	59
2.7 Генотипирование	60
2.8 Статистическая обработка данных	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
3.1 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaPARG-2A</i>	65
3.1.1 Секвенирование гена <i>TaPARG-2A</i>	65
3.1.2 Полиморфизмы гена <i>TaPARG-2A</i>	66
3.1.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaPARG-2A</i>	67
3.1.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaPARG-2A</i> с хозяйственно-ценными признаками	68

3.2 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaPARG-2B</i>	69
3.2.1 Секвенирование гена <i>TaPARG-2B</i>	69
3.2.2 Полиморфизмы гена <i>TaPARG-2B</i>	70
3.3 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaPARG-2D</i>	71
3.3.1 Секвенирование гена <i>TaPARG-2D</i>	71
3.4 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaNLP3-3B</i>	72
3.4.1 Секвенирование гена <i>TaNLP3-3B</i>	72
3.4.2 Полиморфизмы гена <i>TaNLP3-3B</i>	74
3.4.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaNLP3-3B</i>	75
3.4.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaNLP3-3B</i> с хозяйственно-ценными признаками	76
3.5 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaGRF9-6A</i>	80
3.5.1 Секвенирование гена <i>TaGRF9-6A</i>	80
3.5.2 Полиморфизмы гена <i>TaGRF9-6A</i>	82
3.5.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaGRF9-6A</i>	83
3.5.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaGRF9-6A</i> с хозяйственно-ценными признаками	84
3.6 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaGRF9-6B</i>	86
3.6.1 Секвенирование гена <i>TaGRF9-6B</i>	86
3.6.2 Полиморфизмы гена <i>TaGRF9-6B</i>	88
3.6.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaGRF9-6B</i>	88
3.6.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaGRF9-6B</i> с хозяйственно-ценными признаками	90
3.7 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaGRF9-6D</i>	90
3.7.1 Секвенирование гена <i>TaGRF9-6D</i>	90
3.7.2 Полиморфизмы гена <i>TaGRF9-6D</i>	91
3.8 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaBT2-3A</i>	92
3.8.1 Секвенирование гена <i>TaBT2-3A</i>	92
3.8.2 Полиморфизмы гена <i>TaBT2-3A</i>	93
3.8.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaBT2-3A</i>	94

3.8.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaBT2-3A</i> с хозяйственно-ценными признаками	95
3.9 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaBT2-3D</i>	97
3.9.1 Секвенирование гена <i>TaBT2-3D</i>	97
3.9.2 Полиморфизмы гена <i>TaBT2-3D</i>	99
3.10 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaGS2-2A</i>	99
3.10.1 Секвенирование гена <i>TaGS2-2A</i>	99
3.10.2 Полиморфизмы гена <i>TaGS2-2A</i>	101
3.10.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена <i>TaGS2-2A</i>	102
3.10.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaGS2-2A</i> с хозяйственно-ценными признаками	103
3.11 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaNGR5-1D</i>	106
3.11.1 Секвенирование гена <i>TaNGR5-1D</i>	106
3.11.2 Полиморфизмы гена <i>TaNGR5-1D</i>	108
3.11.3 Разработанные маркеры <i>TaNGR5-1B</i>	108
3.11.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaNGR5-1B</i> с хозяйственно-ценными признаками	109
3.12 Молекулярно-генетический анализ гена <i>TaAMT-2B</i>	111
3.12.1 Секвенирование гена <i>TaAMT-2B</i>	111
3.12.2 Полиморфизмы гена <i>TaAMT-2B</i>	112
3.12.3 Разработанные маркеры <i>TaAMT-2B</i>	113
3.12.4 Ассоциация аллельных вариантов гена <i>TaAMT-2B</i> с хозяйственно-ценными признаками	114
4. Обсуждение	117
4.1 Зависимость эффектов аллелей генов азотного обмена от генетического фона	117
4.2 <i>TaPARG-2A</i> : противоречие между прогнозом функциональности и распространённостью аллеля	119
4.3 <i>TaNLP3-3B</i> : ассоциация с фенологией и проблема локализации эффекта	120
4.4 <i>TaGRF9-6A</i> : компенсаторный эффект в фоне <i>Ddw1</i> и асимметрия аллельного разнообразия гомеологов	122
4.5 <i>TaBT2-3A</i> : зависимость эффекта от аллельного состояния <i>Ppd-D1</i>	124

4.6 <i>TaGS2-2A</i> : связь промоторной делеции с наливом зерна и маскировка эффекта транслокацией 1RS.1BL.....	126
4.7 <i>TaNGR5-1B</i> : ассоциация с урожайностью и ограничения интерпретации.....	128
4.8 <i>TaAMT-2B</i> : связь с белковостью зерна и проблема разграничения поглощения и разбавления азота	129
4.9 Асимметрия аллельного разнообразия гомеологов генов азотного обмена....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ	136
Список сокращений	138
Список литературы.....	141
ПРИЛОЖЕНИЕ А	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	158

Введение

Актуальность.

Азот является одним из ключевых элементов, лимитирующих продуктивность злаковых культур, а азотные удобрения – основным агротехническим фактором их урожайности [1,2]. При этом растениями усваивается лишь около половины вносимых неорганических азотных удобрений [3,4]; остальная часть теряется из агроэкосистемы, загрязняя воду и атмосферу. В отличие от многих других факторов урожайности, потенциал улучшения здесь сохраняется при неизменных затратах: речь идёт не о повышении доз удобрения, а о более полном использовании уже вносимого азота.

Эффективность использования азота (NUE, Nitrogen Use Efficiency) – признак полигенный. Его контролируют не только гены ферментов азотного метаболизма и переносчиков азота, но и гены, регулирующие процессы роста, старения, развития корневой системы и архитектуры растения в целом [3–6]. Продуктивность растения, через которую NUE проявляется в хозяйственно-ценных признаках, в свою очередь, также представляет собой многофакторный количественный признак, регулируемый множеством генов [4]. Поэтому панель, собранная только из ферментов и переносчиков, охватила бы лишь один ярус этого контроля.

Ключевые гены азотного обмена у пшеницы и тритикале описаны функционально, однако аллельное разнообразие большинства из них у отечественного селекционного материала не охарактеризовано, а молекулярные маркеры на их аллельное состояние не созданы. Для отдельных генов такие данные получены на китайском материале – например, для генов *TaPARC*, связанных с архитектурой растения и признаками продуктивности [7,8], и для *TaGS2*, связанных с NUE и урожаем [9,10], – но переносить эти результаты на российские коллекции без проверки нельзя. Для других генов, в том числе для семейства AMT, природная изменчивость у пшеницы охарактеризована лишь в первом

приближении [11]. Это создаёт разрыв между знанием о функции гена и возможностью его практического использования в селекции.

Отдельная и практически более острая задача – совместимость генов азотного обмена с генами короткостебельности, которые в своё время произвели революцию в селекции, резко повысив урожайность за счёт устойчивости к полеганию. Современный уровень урожайности пшеницы во многом обеспечен короткостебельными сортами, массово внедрёнными в производство с 1960-х годов. Однако короткостебельность несёт и негативные факторы. Белки DELLA, накапливающиеся в короткостебельных растениях, подавляют не только рост стебля, но и поглощение и ассимиляцию азота, поэтому такие сорта используют азот менее эффективно и для реализации потенциала урожайности нуждаются в высоких дозах удобрений [12]. У тритикале ген короткостебельности *Ddw1* обеспечивает устойчивость к полеганию, снижая высоту растения, но одновременно снижает массу 1000 зёрен и задерживает колошение [13–15]. Селекционеру нужен способ компенсировать эти потери, не отказываясь от короткостебельности. Гены, способные такую компенсацию обеспечить, до настоящей работы не были найдены.

Третье обстоятельство – маскирующее действие интрогрессий. В коллекциях яровой мягкой пшеницы Западной Сибири пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL присутствует у 78% образцов [16]. Транслокация несёт крупный блок генов ржи, повысивших урожайность и устойчивость пшеницы к болезням [17], и её собственный эффект на продуктивность может превосходить эффект отдельного локуса азотного обмена. Это означает, что эффект генов азотного обмена нельзя оценивать, не учитывая генетический фон.

Наконец, азотное питание входит в число немногих факторов урожайности, где потенциал улучшения сохраняется при неизменных затратах. Речь идёт не о повышении доз удобрения, а о более полном использовании уже вносимого азота. Это определяет необходимость многоярусного анализа генов азотного обмена – транспорта, ассимиляции, сигналинга и регуляции роста и архитектуры растения – у отечественного материала с одновременным контролем генов фона:

короткостебельности, фотопериодической чувствительности и крупных интрогрессий. Такой состав панели позволяет сопоставить вклад разных ярусов контроля на одном и том же материале и одними и теми же методами, что и определяет актуальность настоящей работы.

Степень разработанности темы.

Физиологические основы усвоения азота и роль ключевых переносчиков и ферментов (NRT, AMT, GS, GOGAT) подробно описаны в литературе [3]. Гены всех четырёх функциональных групп, представленных в работе, охарактеризованы у модельных растений и злаков. У пшеницы семейство AMT насчитывает более 20 генов [18], но функции большинства из них и их природная изменчивость малоизученны [11]. Наиболее изучены гены *GS2*. На китайском материале описаны гаплотипы *TaGS2*, связанные с NUE и урожаем [19], а экспрессия благоприятного аллеля *TaGS2-2A* повышала перераспределение азота в зерно и урожайность [20]. Ключевые регуляторы сигналинга азота – транскрипционные факторы NLP. NLP7 арабидопсиса служит сенсором нитрата [21,22]. У риса *OsNLP3/4* определяют число зёрен [23]. *NGR5* связывает азотный сигнал с гиббереллинами, а белки DELLA защищают *NGR5* от разрушения, усиливая кущение у короткостебельных сортов [24]. Среди регуляторов роста факторы GRF действуют противоположно DELLA [12], гены *BT2* подавляют поглощение нитрата [25], а *TaPARG* влияет на архитектуру и продуктивность [7]. Взаимодействие генов азотного обмена с генами короткостебельности хорошо изучено у риса [12]. Для пшеницы известен лишь пример *TaGS2-2Ab*, эффект которого проявлялся без мутантных *Rht-B1/Rht-D1* [26]. Для тритикале такие взаимодействия не изучены. Таким образом, мировые данные получены на рисе и арабидопсисе, для пшеницы – на китайском материале. Природная аллельная изменчивость этих генов в отечественном материале, её связь с признаками и зависимость от генов фона остаются неизученными, что определяет цель настоящей работы.

Цель:

Структурно-функциональный анализ генов азотного обмена (*NLP3*, *GRF9*, *BT2*, *GS2*, *NGR5*, *AMT*, *PARG*) у пшеницы и тритикале, разработка на основе

выявленных полиморфизмов молекулярных маркеров и оценка их вклада в хозяйственно-ценные признаки для маркер-ориентированной селекции.

Задачи:

1. На основе референсного генома мягкой пшеницы (IWGSC RefSeq1.0) и данных литературы верифицировать локализацию и структурно-функциональные характеристики известных генов азотного обмена (*NLP3*, *GRF9*, *BT2*, *GS2*, *NGR5*, *AMT*, *PARG*) и отобрать их в качестве генов-кандидатов для дальнейшего анализа.
2. Секвенировать нуклеотидные последовательности отобранных генов, включая промоторные, кодирующие, и 5'/3'-нетранслируемые области у образцов пшеницы и тритикале различного эколого-географического происхождения.
3. Провести биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей генов на наличие и характер полиморфных участков.
4. Разработать и валидировать молекулярные маркеры (KASP и ПЦР) на основе выявленных полиморфных участков генов, позволяющих идентифицировать аллельные варианты.
5. Определить аллельное состояние изучаемых генов, а также генов, контролирующих архитектуру и развитие растения (*Rht-B1*, *Ddw1*, *Ppd-D1*) и пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL в коллекциях пшеницы, тритикале и рекомбинантных линий.
6. Методами ассоциативной генетики оценить статистически значимый вклад аллельных вариантов генов в хозяйственно-ценные признаки пшеницы и тритикале.

Научная новизна.

1. Впервые получены нуклеотидные последовательности генов *TaPARG-2A*, *TaPARG-2B*, *TaPARG-2D*, *TaNLP3-3B*, *TaGRF9-6A*, *TaGRF9-6B*, *TaGRF9-6D*, *TaBT2-3A*, *TaBT2-3D*, *TaGS2-2A*, *TaNGR5-1D*, *TaAMT-2B*, включая промоторные и нетранслируемые области у образцов пшеницы и тритикале отечественной селекции.
2. Впервые в российском селекционном материале описаны полиморфные участки у изученных генов: несинонимичная замена с.793C>T во втором экзоне

гена *TaPARG-2A*, приводящая к аминокислотной замене р.(Н265Y) и к варианту белка с измененной функциональностью; интронный полиморфизм с.1824+137G>A гена *TaNLP3-3B*; делеция 12 п.н. в промоторе гена *TaGRF9-6A*, изменяющая состав цис-регуляторных элементов, включая элементы отклика на абсцизовую кислоту, жасмоновую кислоту и ауксины.

3. На основе выявленных полиморфизмов впервые созданы восемь диагностических маркеров: KASP-маркеры на гены *TaPARG-2A*, *TaNLP3-3B* и *TaGRF9-6B*; STS-маркер на делецию 12 п.н. в промоторе гена *TaGRF9-6A*, дающий продукты 203 и 191 п.н.; маркеры на гены *TaBT2-3A*, *TaGS2-2A*, *TaNGR5-1B* и *TaAMT-2B*.

4. Впервые установлено, что аллель *GRF9-6Ab* с делецией 12 п.н. компенсирует плейотропные потери гена короткостебельности *Ddw1* у тритикале: в присутствии *Ddw1* он ассоциирован с увеличением массы зерна главного колоса на 0,28 г (19,2 %) в 2018 г. и на 0,34 г (16,9 %) в 2019 г., массы 1000 зёрен – на 3,7 г (11,5 %) и 2,9 г (6,6 %) и ускорением колошения на 6,3 и 6,5 дня (10,0 и 10,2 %). В отсутствие *Ddw1* тот же аллель не связан с увеличением массы зерна главного колоса, а со снижением – на 8,6 % и 3,5 %. То есть эффект аллеля определяется генетическим фоном.

5. Впервые показано, что аллель «А» гена *TaNLP3-3B* ассоциирован с ускорением колошения и цветения на 2 дня независимо от аллельного состояния гена *Ppd-D1* (χ^2 -критерий, $p = 5 \times 10^{-36}$ и $p = 5 \times 10^{-30}$), снижением высоты растения на 1,3 см (2 %) и повышением плотности колоса на 2,1 % ($p < 10^{-6}$), не затрагивая при этом компонентов продуктивности.

6. Впервые установлено, что пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL маскирует фенотипическое проявление гена *TaGS2-2A*: у растений без транслокации различие между аллелями по массе зерна с колоса составляет в среднем 0,5 г (56 %), а у растений с транслокацией в среднем на 0,2г (18%). В

коллекции яровой мягкой пшеницы Западной Сибири транслокация присутствует у 78% образцов [16].

7. Впервые определено распределение аллелей гена *TaGS2-2A* в коллекции яровой мягкой пшеницы Западной Сибири: аллель *TaGS2-2Ab* – 108 образцов (60 %), аллель *TaGS2-2Aa* – 60 образцов (33 %), остальные образцы гетерозиготны.

Теоретическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что на генах разных уровней контроля эффективности использования азота показано: вклад аллеля гена азотного обмена в хозяйственно-ценные признаки пшеницы и тритикале не является постоянным свойством аллеля и определяется генетическим фоном. Ген короткостебельности, ген фотопериодической чувствительности или крупная интрогрессия могут менять знак эффекта аллеля, полностью маскировать его или быть условием его проявления. Данные о распределении аллельной изменчивости между гомеологами и между кодирующими и некодирующими областями генов расширяют представления о структуре аллельного разнообразия генов азотного обмена у полиплоидных злаков.

Практическая значимость работы.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью применения разработанных молекулярных маркеров на аллели генов, ассоциированных с азотным обменом, для создания новых коммерчески ценных сортов пшеницы и тритикале, в программах маркер-ориентированной селекции. Охарактеризованы коллекции сортов и линий пшеницы и тритикале на аллельное состояние генов азотного обмена, которые могут быть включены в селекционные программы по созданию сортов с повышенной эффективностью использования азотных удобрений.

Методология и методы исследования.

Диссертация выполнена с применением современных инновационных методов молекулярной генетики и биотехнологии на высокотехнологичном оборудовании. Достоверность результатов подтверждена корректной

статистической обработкой. Методология и методы исследования полностью отражены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту.

1. Полиморфизм гена *TaNLP3-3B* достоверно ассоциирован со скороспелостью пшеницы: аллель «A» (SNP с.1824+137G>A) ускоряет колошение и цветение в среднем на 2 дня ($p < 10^{-30}$), снижает высоту растений на 2,2% и повышает плотность колоса на 2,1% без потери продуктивности, что делает его ключевым маркером для создания раннеспелых форм.

2. Аллель *GRF9-6Ab* гена *TaGRF9-6A* (делеция 12 п.н. в промоторе) у тритикале при наличии гена короткостебельности *Ddw1* ассоциирован с повышением массы зерна с главного колоса на 16,9–19,7% и ускорением колошения в среднем на 6,5 дня, что компенсирует задержку развития, ассоциированную с *Ddw1*, и обосновывает использование этого аллеля в селекции продуктивных короткостебельных тритикале в условиях Центрального Нечерноземья.

3. Аллель *TaGS2-2Aa* гена *TaGS2-2A* (без делеции 10 п.н. в промоторе) оказывает комплексное влияние на элементы продуктивности колоса – он ассоциирован с увеличением массы зерна с колоса в среднем на 30%, числом зёрен в колосе в среднем на 19%, длиной колоса в среднем на 17% и массой 1000 зёрен в среднем на 9%, а редкий аллель *pNGR5-1Ba* гена *TaNGR5-1B* (делеция 4 п.н. в промоторе) ассоциирован с приростом урожайности в среднем на 28,5%, что определяет высокую селекционную ценность обоих маркеров для повышения продуктивности.

4. Ген *TaAMT-2B* демонстрирует двунаправленный эффект: аллель *pAMT-2Bb* повышает урожайность на 13% и массу зерна с колоса на 11%, тогда как аллель *pAMT-2Ba* увеличивает содержание белка в зерне на 3,9% относительно *pAMT-2Bb*, что позволяет дифференцированно отбирать генотипы по продуктивности либо по качеству зерна в зависимости от цели селекции.

Вклад автора. Данная диссертационная работа является результатом четырех лет научных исследований автора. Лабораторная работа, связанная с

генотипированием и наработкой ампликонов для секвенирования генов азотного обмена проводилась автором самостоятельно. Статистическая обработка и представление результатов проводились автором самостоятельно. Помощь в подборе праймеров и анализ результатов секвенирования – к.б.н. Баженов Михаил Сергеевич.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на 4 международных конференциях: XXIII Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», 14–16 ноября, 2023, Москва; XXIV Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», 23–27 сентября, 2024, Москва; VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы, 14–19 июня, 2024, Саратов; VIII Международная научная конференция «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений» (PlantGen2025), 2–5 июля, 2025, Новосибирск.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, из них 3 в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 2 в журналах из перечня ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 162 страницах и содержит 23 рисунка и 27 таблиц, и 2 приложения. Работа состоит из титульного листа, оглавления, введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения и выводов, списка принятых сокращений, списка литературы, включающего 154 источника.

Благодарности. Автор выражает благодарность к.б.н. Баженову Михаилу Сергеевичу за помощь в обработке результатов секвенирования и подборе праймеров; к.б.н. Дивашуку Михаилу Георгиевичу за координацию работы на протяжении всего исследования; акад. Беспаловой Людмиле Андреевне за предоставление семенного материала и данных полевого фенотипирования

коллекций озимой пшеницы и тритикале из НЦЗ имени П.П. Лукьяненко; к.с.-х.н. Игонину Владимиру Николаевичу за предоставление семенного материала и данных полевого фенотипирования коллекции яровой пшеницы.

Автор также благодарит коллективы ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Федерального исследовательского центра «Немчиновка», АО «Щёлково Агрохим» и участников Казахстанско-Сибирской сети по улучшению яровой пшеницы за предоставление семенного материала и данных полевого фенотипирования коллекций яровой и озимой пшеницы.

Особую благодарность автор выражает научному руководителю к.б.н. Кочешковой Алине Александровне за помощь и активное участие на всех этапах исследования.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-76-00043).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Источники азота и пути поступления

Азот является одним из ключевых элементов, лимитирующих продуктивность злаковых культур. Растения способны усваивать азот из почвы в различных формах, которые можно разделить на две основные группы: минеральные формы (нитраты NO_3^- и аммоний NH_4^+) и органические соединения (аминокислоты, пептиды, мочевина) [1,2]. Понимание механизмов поступления этих форм азота имеет критическое значение для селекции сортов с высокой эффективностью азотного обмена (NUE, от англ. Nitrogen Use Efficiency).

В почве азот присутствует в сложном динамическом равновесии. Органический азот почвы подвергается минерализации микроорганизмами-аммонификаторами с образованием аммонийных солей [1]. Затем аммоний может окисляться нитрифицирующими бактериями до нитритов и далее до нитратов. В ризосфере злаков одновременно присутствуют все три формы азота, причем их соотношение зависит от типа почвы, влажности, pH и активности микробиома [2].

В целом цикл азота между растением и почвой можно разделить на две основные части: экологическую (как растение получает азот) и генетическую (как растение использует азот после его усвоения). Существует ряд генетических факторов, влияющих на эффективность поглощения и эффективность использования азота.

Эффективность поглощения (NUpE, от англ. Nitrogen Uptake Efficiency) – это измерение количества азота в сухом веществе, которое усваивается растением. Эффективность использования (NUtE, от англ. Nitrogen Utilization Efficiency) – это эффективность ремобилизации азота в зерно и выход белка. Поглощение азота растением варьирует на разных стадиях развития. Большая часть азота поглощается корнями на вегетативной стадии и усваивается для роста и развития растения. Часть накопленного азота транслоцируется из вегетативных частей в зерно после

цветения. Также большое количество азота поглощается после цветения, что способствует отложению белка в зерне, которое зависит от вида, агротехнических условий, содержания азота в почве и условий окружающей среды. Для пшеницы и риса после цветения поглощается около 20% азота, а для кукурузы 50% [3].

Выявлению генетических основ NUE у сельскохозяйственных растений посвящены обширные исследования, но применение этих исследований в полевых условиях было медленным, в основном из-за сложной природы признака NUE [4,5] и сильного взаимодействия между генотипом и средой [6].

Нитрат – доминирующая форма азота в аэробных почвах. Он является основным источником азота для большинства злаков [2]. Его поглощение регулируется двумя семействами транспортеров. Семейство NPF (NRT1/PTR) – низкоаффинные транспортеры, активирующиеся при высоких концентрациях нитрата (>1 мМ). *NRT1.1* (*NPF6.3*) выполняет функцию трансептора – одновременно транспортирует нитрат и служит его сенсором [27].

У риса ортолог *OsNRT1.1B* обуславливает различия в NUE между подвидами *indica* и *japonica* [28]. У кукурузы *ZmNRT1.1B* (*ZmNPF6.6*) регулирует транспорт и сигналинг нитрата [29]. У пшеницы и ячменя ген *NPF2.12* координирует рост корней и NUE. Высокое содержание азота в листьях и зерне при низком азотном фоне обеспечено аллелем *TaNPF2.12TT*. Нарушение работы этого транспортера активирует сигнальные пути оксида азота за счет повышения экспрессии гена нитратредуктазы *NIA1*, которая стимулирует рост корней и поглощение нитрата [30].

Аммоний преобладает в кислых почвах, анаэробных условиях, например, в рисовых чеках, где затопление создаёт восстановительные условия [28]. Его поглощение связано с белками семейства AMT (*Ammonium Transporters*), которые подразделяются на два подсемейства: AMT1 (высокоаффинные транспортеры, индуцируемые при азотном голодании) и AMT2 (транспортеры с более широким диапазоном аффинности, часто имеющие конститутивный уровень экспрессии). У риса система поглощения аммония особенно развита, за счет высокой экспрессии транспортера *OsAMT1* в корнях [28].

Аммоний энергетически более выгодный источник азота, чем нитрат. Он не требует восстановления, но при высоких концентрациях токсичен для растений. Существуют механизмы регуляции, предотвращающие накопление избыточного аммония. При высоких внешних концентрациях NH_4^+ киназа СРК23 фосфорилирует С-концевой домен АМТ1, вызывая конформационные изменения и блокировку транспортного канала [31]. Кроме того, аммоний повышает концентрацию абсцизовой кислоты (АБК) в корнях через активацию АБК-глюкозилэстеразы; АБК-сигналинг через рецепторы PYL/PYR ингибирует фосфатазы PP2C, что позволяет СРК23 фосфорилировать АМТ и снижать поглощение [31]. У пшеницы идентифицировано шесть генов *TaAMT2*, из которых только *TaAMT2;1* способен транспортировать аммоний, а экспрессия большинства АМТ индуцируется аммонием, что отличает их от модельного растения *Arabidopsis thaliana* [31].

Долгое время считалось, что растения усваивают азот исключительно в минеральной форме, однако в последние десятилетия доказана способность злаков поглощать органический азот, включая аминокислоты, пептиды и мочевину [1]. Основными системами поглощения аминокислот являются высокоаффинный транспортер *LHT1* (*Lysine Histidine Transporter 1*), локализованный в корневых волосках и эпидермисе и обеспечивающий поглощение широкого спектра нейтральных и основных аминокислот, а также семейство пермеаз ААР (*Amino Acid Permeases*) и транспортеры мочевины UPF [32]. Недавние исследования выявили новые механизмы регуляции поглощения органического азота: кальций-зависимая киназа СРК1 взаимодействует с транспортером LHT1 и негативно регулирует его активность [33]. У растений с нокаутом СРК1 наблюдается повышенное поглощение аминокислот, а при увеличении концентрации глутамина количество белка LHT1 снижается, тогда как СРК1 накапливается; идентифицирован потенциальный сайт фосфорилирования Thr151 на LHT1, который может быть мишенью СРК1 [33]. Поглощенные аминокислоты поставляют не только азот, но и углеродный скелет, что снижает энергетические затраты на синтез [33]. В условиях, когда минерализация азота ограничена (низкие температуры, кислые почвы),

органический азот может служить источником питания растений. Кроме того, органические формы менее подвижны в почве по сравнению с нитратами, что снижает экологические риски [33].

Злаковые культуры имеют генную сеть регуляции, которая координирует поглощение разных форм азота в зависимости от их доступности. Сигнальный путь *NRT1.1* у *A. thaliana* влияет на экспрессию аммонийных транспортеров, что обеспечивает сбалансированное поглощение обеих форм минерального азота [27]. Поступление азота у злаков является многоуровневым процессом с участием специализированных транспортных систем для нитратов (*NPF*, *NRT2*), аммония (*AMT*) и органических соединений (*LHT1*, *AAP*). Также у злаков существуют механизмы регуляции, включающие посттрансляционную модификацию транспортеров и интеграцию гормональных сигналов. Понимание этих механизмов открывает возможности для селекции злаков с высокой азотной эффективностью — через использование природных аллельных вариантов транспортеров (например, *NPF2.12* у пшеницы), пирамидирование генов, контролирующих разные компоненты азотного обмена, и редактирование регуляторных элементов, контролирующих экспрессию транспортных систем [2,30].

1.1.1 Ассимиляция азота. Ключевые ферменты

Как только NO_3^- попадает в корень растения, он либо накапливается, либо проходит процесс ассимиляции, в ходе которого восстанавливается и в конечном итоге включается в состав аминокислот. NO_3^- , который не проходит процесс ассимиляции в корне, транспортируется в стебель через ксилему в процессе электрохимического нисходящего движения [34,35].

В стебле NO_3^- усваивается, либо накапливается в вакуолях, или часть его может быть транспортирована обратно в корень [36]. С другой стороны, аммоний обычно не хранится, а усваивается в корне [37]. Усвоение азота в растительной ткани регулируется рядом ключевых ферментов, к которым относятся нитратредуктаза (NR, от англ. Nitrate Reductase), нитрит-редуктаза (NiR, от англ.

Nitrite Reductase), глутаминсинтетаза (GS, от англ. Glutamine Synthetase) и глутамат-синтетаза (GOGAT, от англ. Glutamate Synthase). На первом этапе происходит восстановление до NO_2^- за счет нитратредуктазы. NO_2^- является токсичным для цитозоля клетки и мгновенно транспортируется в пластиды, где проходит еще одно восстановление с помощью нитритредуктазы (NiR) и затем превращается в NH_4^+ . Аммоний затем усваивается в органический азот с помощью глутаминсинтетазы и глутаматсинтетазы (GS/GOGAT) [38].

Нитратредуктаза (NR) Процесс восстановления NO_3^- с образованием NO_2^- под действием нитратредуктазы требует наличия NADH / NAD(P)H / NADPH в качестве доноров электронов. В гексаплоидной пшенице идентифицированы два гена, кодирующие NADH-NR [39]. Уровень активности гена NR в пшенице в значительной степени контролируется генетически, и генотипы, обладающие более высокой активностью NR, имеют более высокий потенциал утилизации азота, особенно когда наличие азота не является лимитирующим фактором [40]. Сверхэкспрессия гена *NR* в пшенице увеличивает содержание белка в зерне без дальнейшего увеличения потребления азота [41], что означает возможное влияние на NUE. Аллельные вариации генов *NR* у риса (*OsNR2*) и сорго не влияют на способность к ассимиляции нитратов NO_3^- ассимиляционной способности и NUE [42,43]. Однако в настоящее время нет подробной информации об аллельных вариациях гена *NR* у пшеницы.

Нитрит-редуктаза (NIR) На втором этапе процесса ассимиляции нитратов нитритредуктаза ферредоксин-зависимая (Fd)-NIR катализирует восстановление нитрита до аммония. Ген, кодирующий NIR, менее изучен по сравнению с другими генами, участвующими в процессе ассимиляции азота, включая NR, GS и GOGAT. В частности, нет подробной характеристики этого гена у пшеницы, хотя он был клонирован из различных видов высших растений, включая шпинат, кукурузу, табак, арабидопсис и рис [44,45]. Единственный ген апопротеина нитритредуктазы был зарегистрирован для шпината и ячменя, в то время как для кукурузы было зарегистрировано не менее двух генов на гаплоидный геном [45]. У табака зарегистрировано четыре гена апопротеина NIR [44].

Глутаминсинтетаза (GS) Глутаминсинтетаза (GS) является наиболее изученным ферментом, поскольку она играет важную роль в усвоении азота в растении [38]. Известны две группы GS, которые локализованы в различных органеллах растительной клетки. GS1 локализуется в цитозоле, который играет роль в первичной ассимиляции NH_4^+ в корнях, а также в повторной ассимиляции NH_4^+ , образующегося при синтезе белков в листьях. GS2 локализуется в пластидах и участвует в реассимиляции фотодыхательного NH_4^+ в хлоропластах и ассимиляции NH_4^+ , образующегося при восстановлении NO_3^- в пластидах [46]. В целом активность GS2 выше, чем GS1, особенно у C3-растений [47].

Глутаматсинтетаза (GOGAT) На первом этапе ассимиляции аммиака совместно с GS работает фермент GOGAT. Он также существует в двух формах, которые играют специфическую роль в процессе первичной ассимиляции или рециркуляции азота. Ферредоксин-зависимый изофермент (Fd-GOGAT) совместно с GS2 участвует в основном в ресимиляции фотодыхательного аммиака, а пиридин-нуклеотид-зависимый изофермент (NADH-GOGAT) участвует в синтезе глутамата, как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих органах или тканях для поддержания роста и развития растений [10].

Нецентральные ферменты. Для таких сложных признаков, как NUE, задействовано большое количество регуляторных путей на разных уровнях. Таким образом, помимо упомянутых выше четырех семейств центральных ферментов, в процесс регуляции NUE вовлечены и другие семейства генов, вносящие свой вклад в процесс регуляции усвоения азота, в частности, семейства глутаматдегидрогеназы (GDH), аланин-аминотрансферазы (AlaAT) и аспарагинсинтетазы. Эти ферменты хорошо изучены у растений с точки зрения их роли в метаболизме аминокислот [48,49]. GDH катализирует взаимопревращения между глутаматом и 2-оксоглутаратом, AlaAT - синтез и деградацию аланина, а ASN катализирует синтез аспарагина и глутамата из аспартата и глутамина.

Глутаматдегидрогеназа (GDH) Существует альтернативный путь синтеза глутамата через включение аммиака в 2-оксоглутарат под действием фермента GDH (Glutamate Dehydrogenase), хотя более 95% доступного аммиака усваивается

через GS/GOGAT-путь [50]. GDH функционирует в направлении деаминирования глутамата для получения органических кислот, в частности, когда клетки корня и листа испытывают дефицит углерода [51,52]. Кроме того, GDH влияет на уровень нижележащих и вышележащих метаболитов углерода и азота через изменения в гетерогексамерной структуре [53].

Гены, кодирующие GDH, были секвенированы у нескольких видов растений: арабидопсиса [54], кукурузы [55] и тритикале [56]. У пшеницы последовательность GDH показала, что GDH менее полиморфна, чем NADH-NAR1 и Fd-GOGAT, между последовательностями, полученными от диплоидных видов *Triticum monococcum*, *Triticum speltoides*, *Aegilops tauschii* и двух сортов гексаплоидной *Triticum aestivum* - Arche и Récital [39]. GDH рассматривается в качестве потенциального гена-кандидата для NUE, поскольку конститутивная экспрессия этого гена приводила к увеличению NUE в ряде модельных и культурных видов, включая рис и табак [53,57]. У пшеницы было установлено, что GDH в значительной степени влияет на рост и продуктивность растений [58].

Аланин-аминотрансфераза (AlaAT): AlaAT (Alanine Aminotransferase) участвует в метаболизме азота ниже по течению от GS и GOGAT, катализируя обратимое образование аланина и 2-оксоглутарата из пирувата и глутамата [45]. AlaAT ячменя (*HvAlaAT*) экспрессируется в других видах сельскохозяйственных культур после трансгенеза, включая канолу [59], рис [48] и сахарный тростник [60], демонстрируя значительное повышение NUE в условиях относительно низкого содержания азота. В частности, в каноле для достижения наивысшего потенциала урожайности требовалось на 40% меньше азотных удобрений, чем растениям дикого типа. Сверхэкспрессия *AlaAT* в растениях *A. thaliana* значительно увеличила NUE [61]. Сверхэкспрессия *HvAlaAT* приводила к увеличению ферментативной активности, высоты и кущения растений, и значительно увеличила вегетативную массу у пшеницы, а у сорго усилила ферментативную активность, но изменений в фенотипе не наблюдалось [62]. В последние годы *AlaAT* вызвала значительный исследовательский интерес у различных видов растений, однако биологический

механизм ее действия в качестве средства повышения NUE у пшеницы еще не изучен.

Аспарагинсинтетаза (AsnS) катализирует перенос амидной группы с глутамина на аспартат, что в свою очередь приводит к образованию аспарагина. Активность AsnS (Asparagine Synthetase) в отношении ремобилизации азота или его утилизации происходит в корне и усиливается во время налива зерна. AsnS кодируется небольшим семейством генов с различным числом изоформ у разных видов растений, например, три у арабидопсиса [63], четыре у гексаплоидной пшеницы и твердой пшеницы [64], и пять у ячменя [65]. У каждого вида охарактеризованы только одна или две изоформы, и остальные гены заслуживают дальнейшего изучения. Кроме того, функциональное подтверждение этих генов у злаков, особенно у пшеницы, отсутствует. Снижение регуляции генов *AsnS1* в корнях, стеблях и листьях во время роста проростков и бутонизации твердой пшеницы при азотном стрессе, а также повышение регуляции в флаговых листьях во время налива зерна, указывают на его роль в ремобилизации азота [66]. У мягкой пшеницы экспрессия как *TaASN1*, так и *TaASN2* повышалась в процессе развития зерна, хотя только на *TaASN1* и *TaASN2* влияло поступление азота. Это свидетельствует о сложных тканеспецифических и изменяющихся в процессе развития реакциях.

1.1.2 Метаболические пулы азота и ремобилизация

Азот, поступающий в растение из почвы в форме нитратов, аммония или органических соединений, распределяется между различными органами и метаболическими пулами, формируя сложную динамическую систему. В период вегетативного роста около половины общего азота, необходимого для развития молодых органов (включая молодые листья и растущие корни), поступает по флоэме из зрелых донорных органов (листьев и корней) после оборота и ремобилизации белков, тогда как другая половина представляет собой вновь поглощенный азот, поступающий по ксилеме с эффективным переносом из

ксилемы во флоэму в стеблевых узлах [67]. Таким образом, рост новых органов в равной степени зависит от двух источников азота – текущего поглощения и ремобилизации накопленных запасов.

Ключевым компонентом системы азотного питания является способность растений к ремобилизации – мобилизации запасенного азота из стареющих вегетативных органов в развивающиеся репродуктивные. У злаковых культур до 75% восстановленного азота в фотосинтезирующих клетках листа локализовано в хлоропластах, причем основную долю хлоропластного азота составляет Рубиско (рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа) [68]. Таким образом, повышение эффективности фотосинтеза в расчете на единицу азота, называемое фотосинтетической эффективностью использования азота (PsNUE), приведет к увеличению NUE. Это может быть достигнуто либо за счет повышения эффективности Рубиско, либо за счет повышения эффективности захвата излучения.

В период старения листьев клеточные белки деградируют до пептидов и аминокислот, которые затем транспортируются в развивающиеся зерновки. Эффективное распределение аминокислот и пептидов внутри растения требует активной работы транспортеров, переносящих азотсодержащие соединения через клеточные мембраны. Транспорт пептидов обеспечивается двумя семействами генов: *OPT* (*oligopeptide transporters*), транспортирующими тетра- и пентапептиды, и семейством *NRT1/PTR* (нитратные/пептидные транспортеры), осуществляющими перенос ди- и трипептидов.

Важнейшую роль в процессе ремобилизации азота играет аутофагия – механизм деградации и реутилизации клеточных компонентов. В условиях азотного дефицита аутофагия индуцируется раньше, а экспрессия генов, связанных с аутофагией (*TaATG8*), увеличивается в 5–7 раз [69]. Это указывает на то, что регуляция аутофагии и повышение ее активности могут служить для оптимизации использования азотных удобрений.

На поздних стадиях роста, когда корневая система уже не способна эффективно поглощать азот, флаговый лист становится основным источником

ремобилизации азота в зерно. Исследования с использованием стабильного изотопа ^{15}N показали, что при внекорневой обработке мочевиной, меченной ^{15}N , азот перемещается по пути «лист – влагалище листа – стебель – стержень колоса – зерно» [70].

Поскольку поглощение азота пшеницей продолжается вплоть до старения листьев, задержка его наступления позволит увеличить NUE, позволив растению поглотить больше азота. Более того, растения с отсроченной сенесценцией обеспечивают больший фотосинтез, что повышает NUE и, следовательно, урожайность зерна [71]. Фенотип замедленного старения обычно называют "Stay-green", который определяется как способность растения сохранять зеленую массу листьев в течение более длительного периода, чем стандартная [71]. Этот признак связан с более высоким содержанием азота в листьях, что приводит к большему выделению азота и углерода на рост корней [72]. В отличие от этого, преимущество по урожайности у остаточно-зеленых сортов объясняется более длительным периодом поглощения азота на стадии налива зерна, хотя это может быть ограничено только на глубоких почвах [73].

Признак Stay-green контролируется генетически, что дает возможность использовать его для повышения эффективности поглощения азота путем селекции. У гексаплоидной пшеницы был выявлен ряд QTL (Quantitative Trait Locus), связанных с компонентами stay-green фенотипа: временем начала сенесценции (OnS), серединой сенесценции (MidS) и интегральным показателем stay-green (SGint) [71,72]. Эти QTL контролируют задержку старения листьев и продление периода фотосинтетической активности флагового листа в период налива зерна. Ген фактора транскрипции *NAM-B1* идентифицирован как ответственный за раннюю сенесценцию у пшеницы [74]. Также были идентифицированы, семейства транскрипционных факторов WRKY и NAC, которые также потенциально могут влиять на признак stay-green [75]. Хотя ряд из них был охарактеризован у некоторых зерновых культур [71,76], ни один из них не был функционально охарактеризован у пшеницы. Таким образом, эти гены могут

стать потенциальными мишенями в селекции для улучшения NUE пшеницы путем манипулирования сенесценцией.

1.2 Генетическая архитектура признаков эффективности использования азота

1.2.1 Количественные локусы (QTL) эффективности использования азота у пшеницы и других злаков

Понимание генетической основы NUE у пшеницы имеет решающее значение при выборе подходящего селекционного подхода для улучшения этого признака. Однако, знания о генетических элементах NUE у злаков до сих пор весьма ограничены. Из всех зерновых культур генетические исследования NUE, проводятся наиболее интенсивно у кукурузы и риса и полученные данные могут быть использованы для изучения пшеницы. Для характеристики генетического контроля NUE пшеницы в этой работе рассматриваются генетические основы тех фенотипов, которые вносят вклад в NUE, во многих случаях с привлечением результатов исследований других родственных видов сельскохозяйственных культур.

Был идентифицирован 51 QTL, контролирующий четыре признака биомассы проростков и пять признаков архитектуры корневой системы (RSA). Наиболее стабильный QTL – *RRS.caas-4DS* – был обнаружен на хромосоме 4DS в области, близкой к гену *Rht-D1*. Этот локус, ассоциированный с соотношением сухой массы корня к побегу, объясняет 13,1% фенотипической вариации и демонстрирует стабильность при различных уровнях азотного питания [77].

С помощью сравнительной геномики идентифицированы консервативные генетические регионы, контролирующих NUE у различных видов. Их анализ позволяет исследовать эволюцию азотного обмена у злаков.

Объединение мета-анализа QTL и сравнительной геномики (ortho-metaQTL) дает возможность найти консервативные регионы, ассоциированные с NUE. У пшеницы идентифицировано 11 таких хромосомных регионов. Эти регионы локализованы совместно с генами *Ppd*, *Vrn* и *Rht* [78]. Это подтверждает эволюционную связь регуляции азотного обмена с контролем фенологических и архитектурных признаков, и объясняет сложность селекции на NUE без сопутствующих изменений других признаков. Примером консервативности QTL-регионов для NUE служит локус на длинном плече хромосомы 3В пшеницы. Было показано, что этот регион содержит ген глутаматсинтазы (*GoGAT*), связанный с первичной ассимиляцией азота [78].

Сравнительный анализ геномов риса, сорго, кукурузы и пшеницы позволил предложить эволюционную модель формирования NUE-локусов у злаков. Согласно этой модели, NUE-регионы произошли от общего предкового хромосомного блока, который в процессе эволюции претерпел ряд реорганизаций. Несмотря на видоспецифичные перестройки ген *GoGAT* и его регуляторные элементы остались консервативными.

Другие гены азотного обмена также демонстрируют высокую степень консервативности. Семейство транспортеров нитрата NRT1 (NPF) и NRT2 представлено ортологичными генами у злаков, хотя число копий генов зависит от ploидности и эволюционной истории вида. Гены глутаминсинтетазы (*GS1*, *GS2*) участвующие в первичной ассимиляции аммония также высококонсервативны.

Благодаря синтении QTL-регионов, идентифицированные в рисе гены-кандидаты могут быть картированы у пшеницы, ячменя и кукурузы. Это позволяет проводить разработку универсальных маркеров на основе консервативных регионов и использовать их в программах маркер-ориентированной селекции (MAS) одновременно для нескольких культур.

1.2.2 Гены транспортеров аммония (АМТ)

В процессе развития растения снижают поглощение аммония за счет регулирования транспортеров поглощения (АМТ) и метаболической детоксикации для преодоления воздействия NH_4^+ [79,80]. Для этого существуют различные механизмы регуляции восприятия, поглощения, компартментации и метаболизма поступающего аммония.

При высоких концентрациях цитозольного аммония в рисе и ячмене (нескольких сотен мМ при внешней концентрации аммония в 10 мМ), ячмень проявлял симптомы отравления и нарушение регуляции аммония, в то время как рис лучше управлял накопленным NH_4^+ [81]. Рис также проявил высокую активность ферментов усвоения аммония и лучший рост в сравнении с кукурузой и томатом [82]. Эти наблюдения подчеркивают важность эффективной стратегии накопления и ассимиляции аммония, которая помогает рису снизить токсичность аммония.

Однако, взаимодействие фенотипических и молекулярных реакций пшеницы на однократное аммонийное питание и его токсичность изучено мало. Исследования физиологических реакций пшеницы на аммонийный стресс проводились, однако, никогда в сочетании с транскрипционными ответами высокоаффинной транспортной системы АМТ1. В то же время, было обнаружено несколько последовательностей, кодирующих АМТ, что предоставляет первое представление о многообразии АМТ у пшеницы [83].

Транскриптомика и протеомика, применяемые для анализа корней проростков пшеницы, показывают, что увеличение соотношения $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ вызывает лигнификацию корней и снижает потребление азота [84]. У высших растений обнаружены две системы поглощения нитратов и аммония из почвы: система транспорта с высоким сродством (HATS, от англ. High-Affinity Transport System) и система транспорта с низким сродством (LATS, от англ. Low-Affinity Transport System) [85,86]. Переносчики нитратов NRT1 и NRT2 контролируются

двумя семействами, а переносчики аммония (AMT) участвуют в переносе аммония и вносят вклад в рост и развитие растений [87]. Увеличение соотношения $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ приводит к выделению O_2 в корнях и повышению активности ферментов, ответственных за биосинтез лигнина, что замедляет рост корней. При высоком уровне $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, кроме симптомов аммонийной токсичности, также наблюдается снижение содержания хлорофилла в листьях.

Различные исследования показали, что высокие концентрации аммония сильно фитотоксичны и способствуют образованию активных форм кислорода (ROS), что вызывает окислительный стресс [88]. Толерантность к аммонии определяется как способность растения ощущать и реагировать на аммонийный стресс до возникновения серьезных повреждений, таких как хлороз и гибель клеток [89].

1.2.3 Гены транспортеров нитратов (*NRT/NPF*)

Для эффективного захвата нитратов из почвы и их транспортировки между клетками внутри растений крайне важны мембраноассоциированные транспортеры.

Существуют два семейства генов, *NRT1* и *NRT2*, которые кодируют транспортные системы с низкой ($K_m \approx \text{мМ}$) и высокой ($K_m \approx \text{мкМ}$) аффинностью соответственно. О важной роли *NRT1* в активации *iLATS*, свидетельствует корреляция между *iLATS* и уровнем *NRT2* транскриптов в корневой системе арабидопсиса, кукурузы и риса. Физиологические исследования показали, что *HATS* существенно влияют на поглощение азота при низких концентрациях NO_3^- . Обилие транскриптов *iHATS* коррелирует с поглощением NO_3^- всей корневой системой [90]. *NRT2* является главным участником поглощения NO_3^- , где *NRT2.1* отвечает за 75% поглощения NO_3^- , а *NRT2.1* и *NRT2.2* вместе составляют более 90%. Также было выявлено, что *NAR2.1* взаимодействует с членами *NRT2.1* и *NRT2.2*, а также с *OsNRT2.3a*.

В мягкой пшенице были идентифицированы *NRT1.1–1.5*, *NRT1.7* и 8 и *NRT2.1–2.5*, хотя *NRT1.6* отсутствует. Эти данные указывают на то, что семейства *NRT1* и *NRT2* высших растений обладают множеством изоформ, некоторые из которых могут быть видоспецифичными.

Оба семейства переносчиков *NPF* и *NRT2* принадлежат к суперсемейству главных посредников (MFS) вторичных активных транспортеров и зависят от доступности протонов для транспортировки нитратов. Большинство нитрат- и пептид-переносчиков, присущих семейству *NRT1/PTR*, являются протон-зависимыми переносчиками.

Переносчики нитратов в гексаплоидной пшенице малоизучены и не описаны. Существует лишь несколько исследований, в которых оценивалось влияние разных условий азотного питания на гены *NPF* и *NRT*. Большая часть исследований пшеницы была проведена на генах *TaNRT2*. Сверхэкспрессия *TaNRT2.5* связана с повышенным потреблением нитратов зерном и урожайностью. *TaNRT2.1* был связан с поглощением нитратов пшеницей после цветения. Экспрессия *TaNRT2.1* может быть вызвана азотным голоданием и абсцизовой кислотой (АБК) [53,91,92]. Выполнены некоторые филогенетические исследования и исследования экспрессии генов *NPF* и *NRT2* [93], но они недостаточны.

Среди злаковых растений наиболее изученным является рис. В отличие от подобных генов у *A.thaliana*, дополнительный белок *OsNAR2.1* взаимодействует с тремя переносчиками *NRT2* (*NRT2.1*, *NRT2.2* и *NRT2.3a*). Транспортеры нитратов *NAR2/NRT2*, такие как *OsNAR2.1*, *OsNAR2.2*, *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* и *OsNRT2.3a*, преимущественно экспрессируются в корнях, в то время как *OsNRT2.3b* и *OsNRT2.4*, в основном, проявляют активность в побегах.

1.2.4 Гены глутаминсинтетазы (GS)

Глутаминсинтетаза (GS) является ферментом первичной ассимиляции аммония, катализирующим реакцию образования глутамина из глутамата и аммония. У риса и других злаков это семейство представлено несколькими

изоформами, различающимися по субклеточной локализации и тканеспецифичности экспрессии.

Цитозольная изоформа GS1;1 играет критическую роль в ремобилизации азота из стареющих органов. Исследования с использованием нокаутных мутантов риса показали, что GS1;1 необходима для эффективного экспорта азота из листьев в развивающиеся зерновки [94]. У риса GS1;1 экспрессируется в клетках флоэмы стареющих листьев, где она обеспечивает синтез глутамина, который является основной транспортной формы азота во флоэме. Поскольку до 80% азота метелки риса поступает за счет ремобилизации из листьев, GS1;1 должен рассматриваться как один из основных генов-кандидатов для повышения NUtE [94].

Цитозольная изоформа GS1;2 у риса участвует в первичной ассимиляции аммония в корнях, обеспечивая поступление азота в растение. У пшеницы ортологи GS1 также демонстрируют повышенную экспрессию в условиях низкого азотного питания, что указывает на их адаптивную роль.

Пластидная изоформа GS2 локализована в хлоропластах и участвует в реассимиляции аммония, высвобождающегося при фотодыхании. Хотя GS2 важна для поддержания азотного баланса в фотосинтезирующих тканях, ее вклад в ремобилизацию азота в зерно менее значителен по сравнению с цитозольными изоформами.

В пшенице GS1 имеет три изоформы, а GS2 – одну. Изменения экспрессии двух генов GS коррелируют с генетической изменчивостью NUE, что свидетельствует о регуляции этого признака семейством генов GS. В качестве примера можно привести культуру озимой пшеницы, которая демонстрировала более высокую экспрессию *TaGS1* на стадии постантезы и *TaGS2* на стадии преантезы по сравнению с культурой, не получавшей достаточного количества азота [9]. Разнообразие генетических регуляторов усвоения азота и урожайности или признаков, способствующих повышению урожайности пшеницы, было широко представлено [10,38,45,95], что указывает на потенциал улучшения NUE с помощью традиционных стратегий селекции.

1.2.5 Гены глутаматсинтазы (*GOGAT*)

Глутаматсинтаза (*GOGAT*) катализирует перенос амидной группы глутамина на 2-оксоглутарат с образованием двух молекул глутамата. У злаков идентифицированы две основные формы: *NADH-GOGAT* и *Fd-GOGAT*.

NADH-GOGAT1 участвует в реутилизации азота в развивающихся органах. У риса этот фермент локализован в пластидах клеток проводящей системы развивающихся листьев и зерновок [96]. Иммуноцитологические исследования показали, что *NADH-GOGAT1* участвует в утилизации глутамина, транспортируемого из сенсорирующих органов по флоэме. В экспериментах по сверхэкспрессии гена *NADH-GOGAT1* была установлена связь с увеличением массы зерна до 80%, что подтверждает участие этого фермента в азотной утилизации и наливе зерна [96].

NADH-GOGAT2 у риса преимущественно экспрессируется в корнях и участвует в первичной ассимиляции аммония. Совместно с *GS1;2* он обеспечивает эффективное усвоение аммония из почвы [94]. Физическое картирование, секвенирование и аннотация этого региона позволили установить, что *GoGAT* сохраняет структурную и функциональную консервативность в ортологичных позициях геномов риса, сорго и кукурузы [78]. Это открытие демонстрирует, что *NADH-GOGAT* является эволюционно стабильным геном-кандидатом для селекции на повышение NUtE.

Последовательность гена *Fd-GOGAT* пшеницы показала, что этот ген является высококонсервативным; как среди трех гомеологичных генов гексаплоидной пшеницы, так и в сравнении с другими растениями [97]. Выявлена аллельная вариация *Fd-GOGAT* у твердой пшеницы, связанная с GPC, что потенциально полезно для селекционных программ [97]. *NADH-зависимый GOGAT* имеет три гомолога в гексаплоидной пшенице, имеющие высокий уровень консервативности [98,99], что соответствует ключевой метаболической роли этого гена. Изменение экспрессии двух генов *NADH-GOGAT* (*NADH-GOGAT-3A* и

NADH-GOGAT-3B) ассоциируется с более высоким содержанием белка в зерне у сортов твердой пшеницы [98,99]. Несмотря на значительную перестановку последовательностей в процессе эволюции пшеницы, как *Fd-GOGAT*, так и *NADH-GOGAT* остались консервативными в субгеномах пшеницы. Примечательно, что один NUE QTL также сохранился в том же ортологичном локусе гена *GOGAT* на хромосоме 3В пшеницы, хромосоме 1 риса, а также на хромосомах 3 и 8 кукурузы [78].

1.2.6 Гены аспарагинсинтетазы (ASN) и аланинаминотрансферазы (AlaAT)

Помимо центрального GS/GOGAT-пути, в метаболизме азота у злаков участвуют дополнительные ферменты, обеспечивающие синтез транспортных форм азота и его реутилизацию. К ним относятся аспарагинсинтетаза (ASN) и аланинаминотрансфераза (AlaAT).

Аспарагинсинтетаза (ASN) катализирует синтез аспарагина из аспартата и глутамина, который служит транспортной формой азота и метаболитом, определяющим качество и безопасность зерна (свободный аспарагин является предшественником акриламида).

Семейство ASN пшеницы представлено четырьмя генами (*TaASN1–TaASN4*). Исследования экспрессии показывают, что *TaASN2* активен в зародыше и эндосперме на поздних стадиях развития зерна. Экспрессия *TaASN1* и *TaASN2* увеличивается по мере развития зерна, причем на *TaASN1* влияет как азотное, так и серное питание. Недавние исследования на твердой пшенице выявили четыре изоформы AsnS1 и AsnS2, которые локализованы в 5-й и 3-й гомеологичных группах хромосом соответственно. Хотя в условиях азотного стресса экспрессия этих генов подавляется в корнях и стеблях, предполагается их участие в ремобилизации азота из флагового листа в зерно [100]. Идентифицировано 14 членов семейства ASN у пшеницы, которые локализованы на 11 хромосомах и

вовлечены в азотный обмен и реакции на гормональные (АБК, гиббереллин) и стрессовые сигналы (засуха, засоление).

У риса трансгенные линии с нокаутом *OsASN1* снижали урожайность и содержание белка, тогда как сверхэкспрессия *OsASN1* приводила к увеличению этих показателей как при нормальном, так и при низком азотном питании [101]. Растения с повышенной экспрессией *OsASN1* демонстрировали более эффективное поглощение и ассимиляцию азота, и высокую толерантность к азотному дефициту. Ген *OsASN2* влияет на раннее развитие семян, их прорастание и накопление белка в эндосперме.

Аланинаминотрансфераза (AlaAT) катализирует обратимое образование аланина и 2-оксоглутарата из пирувата и глутамата, связывая метаболизм азота с энергетическим обменом клетки [102].

Трансгенные линии риса со сверхэкспрессией аланинаминотрансферазы ячменя (*HvAlaAT*) под тканеспецифичным промотором *OsAnt1* демонстрировали усиление метаболизма углерода (гликолиз, цикл трикарбоновых кислот) без изменения темпов поглощения нитратов и аммония [103]. Такой метаболический сдвиг обеспечивал увеличение биомассы и урожайности за счет лучшей утилизации уже поглощенного азота. Трансплантация этой конструкции в ячмень и пшеницу также показала увеличение продуктивности семян в контролируемых условиях [104]. Сверхэкспрессия гена риса (*OsAlaAT1*) в пшенице с использованием промотора *TaAnt1* привела к увеличению высоты, массы 1000 зерен и положительно повлияла на экспрессию генов, связанных с синтезом крахмала [105]. Похожие эффекты были отмечены и в полевых условиях, где трансгенные линии показали лучшую азотную эффективность и отзывчивость на удобрения.

1.3 Молекулярно-генетические механизмы регуляции азотного обмена

1.3.1 Узнавание нитрата: роль NRT1.1/NRT1.1B и NLP-факторов

Нитрат (NO_3^-) выступает сигнальным фактором, запускающим сложные каскады транскрипционных изменений, которые координируют метаболизм, рост и развитие [106]. Узнаванием азота (nitrate sensing) называется способность растений воспринимать внешнюю и внутреннюю концентрацию нитрата и адекватно реагировать на ее изменения. За последние два десятилетия в этой области был достигнут прогресс: идентифицированы ключевые сенсорные белки, расшифрованы механизмы передачи сигнала и установлены связи между восприятием нитрата и регуляцией экспрессии генов [107].

Белок NRT1.1 связан с узнаванием нитрата у *A. thaliana* [108,109]. Этот белок принадлежит к семейству NPF (NRT1/PTR) и одновременно является транспортером нитрата и рецептором, воспринимающим нитрат во внеклеточной среде [109].

Транскрипционный фактор *NLP7* (*NIN-like protein 7*) также способен связывать нитрат, выполняя функцию внутриклеточного сенсора [21,107]. *NLP7* выступает не только как эффектор, но и как первичный сенсор, воспринимающий нитрат непосредственно в цитоплазме [109]. В настоящее время сложилось представление о двухуровневой системе узнавания нитрата: мембранно-связанный NRT1.1, который воспринимает внеклеточный нитрат, а внутриклеточный NLP7 реагирует на его концентрацию в цитозоле.

Наиболее детально механизмы узнавания нитрата изучены на модельных растениях: арабидопсисе и рисе. *OsNRT1.1B* инициирует два независимых сигнальных каскада, которые обеспечивают эффективную адаптацию растения к изменяющейся азотной обеспеченности. Первый путь включает взаимодействие *OsNRT1.1B* с E3-убиквитинлигазой *OsNBIP1*. Это взаимодействие приводит к деградации ингибиторного белка *OsSPX4*, который в отсутствие нитрата связывает

и удерживает в цитоплазме ключевой транскрипционный фактор OsNLP3. Деградация OsSPX4 высвобождает OsNLP3, позволяя ему переместиться в ядро и инициировать экспрессию генов, ответственных за ассимиляцию азота [108]. Второй путь связан с активацией кальциевого сигнала. У риса нитратный сенсор OsNRT1.1B образует комплекс с двумя кальциевыми каналами – OsCNGC14 и OsCNGC16, которые формируют гетеромер [108]. Этот комплекс воспринимает нитрат и инициирует вход ионов кальция в цитоплазму, что приводит к активации кальций-зависимых протеинкиназ (CPKs), которые фосфорилируют транскрипционный фактор OsNLP3. Фосфорилирование ускоряет его ядерный импорт и значительно усиливает транскрипционную активность [108]. Этот путь обеспечивает первичный ответ на поступление нитрата. При продолжительном поступлении нитрата это приводит к устойчивому накоплению OsNLP3 и поддержанию высокой экспрессии азот-зависимых генов [108]. Если кальциевый сигнал отсутствует, положительная обратная связь не формируется, что приводит к снижению экспрессии *OsNLP3* и, как следствие, к ростовым нарушениям в условиях низкого азота.

Долгое время считалось, что NLP7 выполняет эффекторные функции в сигнальном пути ниже NRT1.1. Однако NLP7 напрямую взаимодействует с нитратом, причем это взаимодействие имеет высокую аффинность [21]. В отсутствие нитрата NLP7 преимущественно локализован в цитоплазме; при поступлении нитрата он перемещается в ядро, где инициирует транскрипцию сотен генов, участвующих в метаболизме азота [107]. Эта ядерная ретенция, зависящая от нитрата, является механизмом, связывающим внешний сигнал с транскрипционной перестройкой. Более того, NLP7 функционирует в режиме «hit-and-run» («нанести удар и уйти»): он быстро активирует целевые гены, после чего диссоциирует от хроматина, позволяя другим факторам поддерживать транскрипцию на достигнутом уровне [107]. Такой механизм обеспечивает быструю и эффективную реакцию на изменение азотного статуса.

Кальций (Ca^{2+}) играет фундаментальную роль в передаче сигнала при узнавании нитрата. Возникающий кальциевый сигнал имеет характерные

пространственно-временные характеристики, которые декодируются специализированными сенсорами – кальций-зависимыми протеинкиназами (CPKs) и кальциневрин-подобными фосфатазами (CBL-CIPK). Кальциевый сигнал, генерируемый в ответ на нитрат, не только активирует NLP-факторы, но и модулирует активность других транскрипционных регуляторов, обеспечивая интеграцию азотного сигнала с другими физиологическими процессами.

Оксид азота (NO) выступает еще одним компонентом системы узнавания азота у растений. NO образуется в растениях как побочный продукт метаболизма нитрата, в частности, в ходе реакции, катализируемой нитратредуктазой (NR, от англ. Nitrate Reductase), а также за счет активности NO-синтазоподобных ферментов [110]. NO необходим для полноценной первичной нитратной реакции (PNR – primary nitrate response). Механизм действия NO связан с посттрансляционной модификацией белков – S-нитрозилированием, то есть присоединением NO-группы к цистеиновым остаткам. Кроме того, NO участвует в регуляции редокс-гомеостаза, влияя на активность антиоксидантных ферментов (каталазы, аскорбатпероксидазы), что также сказывается на чувствительности растений к азотному статусу [110].

Система узнавания азота у растений не ограничивается изолированным восприятием нитрата отдельными клетками. Современные исследования подчеркивают важность пространственной и временной организации этого процесса [107]. На временном уровне ответ на нитрат развивается каскадно. Первичный ответ опосредуется быстрыми посттрансляционными механизмами: активацией кальциевых каналов, фосфорилированием NLP7 и его ядерной транслокацией. Вторичный ответ связан с изменениями экспрессии генов, включая активацию положительных обратных связей. Долговременная адаптация проявляется в перестройке архитектуры корневой системы, изменении соотношения латеральных корней и других морфологических адаптациях [111]. На пространственном уровне узнавание азота организовано с учетом клеточной и тканевой специфичности. В корне различные клеточные типы (эпидермис, кора, эндодерма, перицикл) по-разному реагируют на нитрат. Кроме того, существует

система дальнего (системного) сигналинга, связывающая корни и побеги. Пептиды CEP (C-terminally Encoded Peptides), продуцируемые корнями в ответ на азотное голодание, транспортируются в листья, где взаимодействуют с рецепторами CEPR (CEPR1), запуская сигнальный каскад, который модулирует экспрессию азотных транспортеров в корнях и рост латеральных корней [109].

Сигнальный путь NRT1.1/NRT1.1B представляет собой центральную интеграционную платформу, объединяющую восприятие нитрата, кальциевую сигнализацию, убиквитин-зависимую деградацию репрессоров, транскрипционную регуляцию с положительной обратной связью и перекрестные взаимодействия с гормональными сигналами (АБК). Понимание этих механизмов создает основу для селекции и генетического редактирования злаковых культур с целью повышения эффективности использования азота – способности сохранять высокую продуктивность при сниженных дозах азотных удобрений.

Сравнительный анализ систем узнавания азота у разных групп растений выявляет как консервативные черты, так и видовую специфику. Ключевые компоненты – NRT1.1/NRT1.1B и NLP7/NLP3 – присутствуют у всех исследованных высших растений, что свидетельствует о древнем происхождении этой сигнальной системы [106]. Однако существуют важные различия между видами. У пшеницы и других злаков, по-видимому, действуют механизмы, сходные с рисовыми.

1.3.2 Интеграция углеродного и азотного сигналов: TOR, SnRK1, Tre6P

Углеродный и азотный метаболизмы у растений образуют единую интегративную систему, от баланса которой зависят рост, развитие и продуктивность. Фотосинтез требует значительных вложений азота в хлорофилл, ферменты и структурные компоненты фотосинтетического аппарата, тогда как поглощение и ассимиляция азота, в свою очередь, зависят от АТФ, восстановительных эквивалентов и углеродных скелетов, поставляемых фотосинтезом [112]. Это делает способность растений воспринимать и адекватно

реагировать на изменения соотношения углерода и азота (C/N-баланса) необходимым для выживания. Сложные сигнальные сети, обеспечивающие эту интеграцию, включают центральные киназные комплексы TOR (Target of Rapamycin) и SnRK1 (SNF1-Related Protein Kinase 1), которые действуют как антагонистические регуляторы, координируя анаболические и катаболические процессы в зависимости от энергетического и метаболического статуса клетки [113].

Киназный комплекс SnRK1 активируется в условиях энергетического стресса и запускает катаболические программы, направленные на мобилизацию запасных ресурсов и ограничение роста. Комплекс TOR активен при благоприятном C/N-балансе, когда ресурсы достаточны для анаболических процессов, и стимулирует биосинтез белка, клеточное деление и рост [112,113]. Трегалозо-6-фосфат (Тре6P) связывает углеродный статус с сигнальным каскадом SnRK1. Он ослабляет взаимодействие каталитической субъединицы SnRK1 (KIN10) с киназой GRIK и ингибирует активность SnRK1. Поскольку уровень Тре6P положительно коррелирует с содержанием углеводов, этот механизм связывает углеродный статус и регуляцию энергетического гомеостаза [113].

В систему узнавания C/N-баланса входит белок PII, который связывает 2-оксоглутарат и АТФ/АДФ, регулируя активность ферментов азотного метаболизма, в том числе глутаминсинтетазы и аргининсукцинатсинтетазы. PII действует как интегратор сигналов о соотношении углеродных и азотных метаболитов на посттрансляционном уровне [113]. Эти центральные сигнальные комплексы взаимодействуют с гормональными сетями, обеспечивая тонкую настройку роста и развития в зависимости от доступности ресурсов.

1.3.3 Гормональная регуляция азотного ответа (ауксины, цитокинины, гиббереллины, АБК)

Гормональная регуляция, опосредующая влияние C/N-баланса на архитектуру растения, прежде всего задействует ауксины, цитокинины,

абсцизовую кислоту (АБК) и гиббереллины. Центральную роль в интеграции азотного сигнала с гормональными путями играет нитратный сенсор NRT1.1, который не только транспортирует нитрат и воспринимает его, но и напрямую влияет на распределение ауксина в корневой системе [109,114]. При низком содержании нитрата NRT1.1 способствует транспорту ауксина из корневых тканей, ограничивая формирование латеральных корней. При высоком содержании нитрата этот эффект снимается, что позволяет развивать разветвленную корневую систему для эффективного поглощения азота. Этот механизм иллюстрирует, как первичный сигнал азотной обеспеченности преобразуется в специфическую гормональную программу, определяющую архитектуру корня.

Цитокинины выступают в роли системных сигналов, информирующих корневую систему о азотном статусе надземной части. При высоком содержании нитрата и благоприятном C/N-балансе в побегах активируется синтез цитокининов, которые транспортируются в корни по флоэме и ингибируют элонгацию латеральных корней. Этот механизм предотвращает избыточное развитие корневой системы, когда в почве достаточно доступного азота, и позволяет растению направлять ресурсы на рост побегов и репродуктивных органов [115]. Одновременно цитокинины регулируют экспрессию генов транспортеров нитрата (NRT2.1), создавая обратную связь, которая модулирует поглощение азота в соответствии с потребностями всего организма. У злаковых культур цитокинины также участвуют в регуляции кущения и высоты стебля, интегрируя сигналы азотного статуса с программой развития побегов [115].

Гиббереллины (ГК) и абсцизовая кислота (АБК) действуют как антагонистические регуляторы, опосредующие влияние C/N-баланса на прорастание семян и рост побегов. Высокое соотношение углерода к азоту (богатый углеводами, но бедный азотом субстрат) способствует накоплению АБК и подавлению прорастания, тогда как сбалансированное C/N-отношение активирует синтез ГК и стимулирует переход к активному росту. У проростков злаков гиббереллины регулируют высоту стебля и длину междоузлий, причем эта регуляция модулируется азотным питанием [115]. У риса и пшеницы показано, что

гены полукарликовости *Rht*, связанные с гиббереллиновой сигнализацией, существенно влияют на отзывчивость на азотные удобрения: растения с аллелями низкостебельности демонстрируют меньшую эффективность использования азота по сравнению с высокорослыми формами.

NO влияет на активность транскрипционных факторов семейства ERF и стабильность DELLA-белков (репрессоров гиббереллиновой сигнализации), а также участвует в регуляции чувствительности к АБК. Таким образом, NO связывает первичный метаболизм азота с гормональными каскадами. Это обеспечивает согласованную реакцию на изменение C/N-баланса.

Интеграция C/N-сигналов и гормональных путей происходит также за счет пептидной сигнализации. При азотном дефиците корни продуцируют пептиды CEP (C-terminally Encoded Peptides), которые транспортируются в листья и взаимодействуют с рецепторами CEPR. Это запускает сигнальный каскад, приводящий к снижению экспрессии генов цитокининового синтеза и, как следствие, к ослаблению ингибирования роста латеральных корней, что позволяет растению адаптивно увеличивать корневую систему для поиска азота [109].

Таким образом, взаимодействие сигнальных путей азота и углерода с гормональной регуляцией у злаков представляет собой многоуровневую сеть, в которой центральные киназные комплексы (TOR и SnRK1), метаболические сенсоры (PII, TrebP), нитратный трансептор NRT1.1 и гормоны (ауксины, цитокинины, гиббереллины, АБК) действуют согласованно, обеспечивая адаптацию роста и развития к изменяющимся условиям питания.

1.3.4 Эпигенетическая регуляция (метилование ДНК, гистоновые модификации)

Одним из механизмов адаптивности к изменениям содержания азота являются эпигенетические модификации – изменения структуры хроматина, регулирующие экспрессию генов без изменения последовательности ДНК. К ним относятся метилирование ДНК, гистоновые модификации (ацетилирование,

метилование), а также малые некодирующие РНК. Эти механизмы обеспечивают быстрое перепрограммирование транскрипции в ответ на азотный статус.

Метилирование ДНК (присоединение метильной группы к цитозину) обычно подавляет транскрипцию. У риса длительное азотное голодание индуцирует наследуемые изменения метилирования, которые передаются потомству и повышают толерантность к стрессу [116].

Гистоновые модификации определяют компактизацию хроматина и доступность генов. Ацетилирование H3K27ac и триметилирование H3K4me3/H3K36me3 связаны с активацией транскрипции, тогда как H3K27me3 и H3K9me2/3 – с репрессией. Исследования на томатах показали высокую динамичность этих меток в ответ на нитрат, особенно H3K27ac, причём паттерны различались в корнях и побегах, отражая орган-специфичную регуляцию [117].

У арабидопсиса комплекс PRC2, устанавливающий H3K27me3, ослабляет экспрессию нитратного транспортера *NRT2.1* даже при его индукции нитратом. Ген *HNI9* (компонент РНК-полимеразы II) при высоком уровне азота усиливает репрессию *NRT2.1* через увеличение H3K27me3. У кукурузы белок ZmCHB101 влияет на динамику H3K4me3 и H3K27me3 в локусах *NRT2.1* и *NRT2.2*, необходим для правильной установки гистоновых меток при изменении азотного питания [118].

Сравнительный анализ сортов гексаплоидной пшеницы, контрастных по эффективности использования азота, показал, что изменения гистоновых модификаций в корнях, листьях и семенах коррелируют с перестройкой корневой системы и поглощением азота в условиях его дефицита. Эпигенетическая регуляция может быть одним из факторов сортовых различий по азотной эффективности [119].

Установка H3K27me3 комплексом PRC2 часто сочетается с метилированием ДНК, создавая устойчивое репрессивное состояние хроматина. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) участвуют в рекрутировании ремоделирующих комплексов (например, lncRNA T5120 у арабидопсиса регулирует ответ на нитрат) [118].

1.4 Гены, интегрирующие азотный обмен и архитектуру растения

1.4.1 DELLA-белки и их влияние на эффективность азотного обмена

1.4.2 Транскрипционные факторы GRF (Growth-Regulating Factors): регуляция роста и компенсация негативных эффектов короткостебельности

Гены *GRF* (*Growth-Regulating Factors*) – семейство транскрипционных факторов, которые специфичны для растений и участвуют в регуляции роста и развития органов, а также в ответе на азотное питание и стрессовые воздействия.

Активности *GRF* регулируется за счет посттранскрипционного подавления микроРНК miR396. Эта микроРНК связывается с транскриптами генов *GRF* и ограничивает их экспрессию. Мутации в сайте связывания miR396 делают ген нечувствительным к посттранскрипционному подавлению, что приводит к повышенной экспрессии *GRF*, увеличению размера зерна и улучшению метаболизма азота и углерода [12].

Наиболее изученным представителем семейства у злаков является *GRF4*, который выполняет функцию регулятора, интегрирующего метаболизм азота и углерода. Белок *GRF4* физически взаимодействует с DELLA-репрессором роста. Это создает баланс между ростом и усвоением питательных веществ. Высокий уровень экспрессии *GRF4* увеличивает урожайность при низком уровне внесения удобрений [12]. У сортов «Зеленой революции» накопление мутантных DELLA-белков снижает активность *GRF4*. Это приводит к уменьшению NUE. Таким сортам необходимы большие дозы азотных удобрений для поддержания продуктивности [12].

Также *GRF4* регулирует экспрессию гена *MYB61*, который контролирует синтез целлюлозы и накопление биомассы. Вариант *indica MYB61* имеет высокую транскрипцию и ассоциирован с повышенной NUE [120]. Таким образом, *GRF*

выступают в роли центральных координаторов азотного и углеродного метаболизма у злаков.

1.4.3 Ген *NGR5* как интегратор гиббереллиновой сигнализации и азотного метаболизма

Ген *NGR5* (*Nitrogen-mediated Tiller Growth Response 5*), принадлежащий к семейству транскрипционных факторов AP2/EREBP, был идентифицирован у риса как регулятор реакции кущения на уровень азотного питания. Этот ген интегрирует сигналы гиббереллиновой сигнализации и азотного метаболизма, что позволяет растению координировать архитектуру побега с доступностью азота [24].

Как и в случае с *GRF4*, белок *NGR5* взаимодействует с DELLA-репрессорами роста. *NGR5* конкурирует с DELLA за связывание с рецептором гиббереллина GID1. При связывании с GID1 *NGR5* подвергается убиквитинированию и последующей деградации в протеасомах. Накопление DELLA-белков у короткостебельных сортов защищает *NGR5* от деградации, способствуя его стабилизации.

Повышенная стабильность *NGR5* в присутствии DELLA усиливает кущение и способствует формированию большего числа продуктивных побегов. *NGR5* способен взаимодействовать с компонентами поликомб-репрессивного комплекса 2 (PRC2), что меняет паттерн триметилирования гистона H3 по 27-му лизину (H3K27me3) в ответ на изменение доступности азота. Так *NGR5* связывает сигналы азота с эпигенетической регуляцией транскрипции [24].

Повышение уровня экспрессии *NGR5* стимулирует кущение и увеличивает урожайность риса при низком уровне внесения азотных удобрений. Это позволяет разорвать связь кущения и продуктивность с уровнем азотного питания.

1.4.4 Другие регуляторы (семейства GRAS, AP2/EREBP)

В семейство GRAS входят белки DELLA – центральные репрессоры гиббереллиновой сигнализации и роста растений. Белки DELLA относятся к семейству транскрипционных регуляторов GRAS и модулируют транскрипционную активность через белок-белковые взаимодействия по крайней мере с 15 различными классами транскрипционных факторов. Гены полукарликовости *Rht-B1b* и *Rht-D1b* у пшеницы, широко использовавшиеся в «Зеленой революции», кодируют укороченные формы DELLA-белков, устойчивые к гиббереллин-опосредованной деградации. Более 70% современных сортов пшеницы несут такие аллели. Основным недостатком этих аллелей заключается в том, что они не только снижают высоту растений, но и подавляют активность генов азотного обмена, что приводит к снижению эффективности использования азота и требует внесения повышенных доз удобрений для достижения высоких урожаев.

Альтернативой мутациям в генах *DELLA* могут служить мутации в генах-партнерах *DELLA*, например, в генах *IDD5* у пшеницы и *SDW3* у ячменя, которые физически взаимодействуют с DELLA-белками и регулируют высоту растений. Такие мутации не снижают эффективность использования азота, что открывает новые возможности для селекции короткостебельных сортов.

Семейство AP2/EREBP представлено множеством генов, участвующих в регуляции роста, развития и стрессовых ответов. У пшеницы гены *TaPARG* (*Plant Architecture-Related Gene*) этого семейства обладают плеiotропными функциями, регулируя высоту растений, число продуктивных побегов, длину колоса и массу 1000 зерен. Исследования на рисе также показывают, что гены *OsAP2* и *OsEREBP* участвуют в ответе на азотный стресс [7].

1.5 Генетические ресурсы и современные подходы для селекции злаков с высокой азотной эффективностью

1.5.1 Дикие сородичи и местные сорта как источники аллелей для улучшения NUE

Эффективность использования азота – полигенный признак, контролируемый сложными генными сетями, взаимодействующими с факторами окружающей среды. Это делает традиционные методы селекции малоэффективными. Разработка и внедрение геномных технологий позволяет ускорить создание сортов с высокой NUE [121].

Источником генетического разнообразия могут служить дикие сородичи культурных злаков и местные сорта, адаптированные к условиям низкого азотного питания. *Aegilops tauschii* – диплоидный предок D-субгенома пшеницы, обладает широким спектром аллелей, связанных с NUE. В исследовании на 145 синтетических линиях с различными аллелями *Ae. tauschii*, была выявлена вариабельность по урожайности и накоплению азота в зерне в условиях низкого азотного фона [122].

Дикий эммер (*Triticum dicoccoides*) – источник генов, повышающих NUE. Ген *Gpc-B1*, кодирующий NAC-транскрипционный фактор, ускоряет старение листьев и ремобилизацию азота в зерно. Он был интрогрессирован из дикой двузернянки в культурную пшеницу и используется для повышения содержания белка в зерне. Также был охарактеризован QTL на хромосоме 5B (*QGpc.huj.uh-5B.2*), происходящий из двухзернянки. Интрогрессия этого локуса в мягкую пшеницу увеличивает содержание белка в зерне на 33% в условиях азотного дефицита [123].

1.5.2 Высокопроизводительное фенотипирование и генотипирование

Высокопроизводительное фенотипирование (НТР) набирает популярность в селекции на эффективность использования азота, поскольку традиционные методы оценки признаков корневой системы и азотного статуса трудоемки и низкопроизводительны. Современные платформы включают использование магнитно-резонансной томографии (MRI) и компьютерной томографии (X-ray CT) для неинвазивной визуализации архитектуры корневой системы, а также мультиспектральную съемку с беспилотных летательных аппаратов (UAV) для оценки вегетационного индекса (NDVI), содержания хлорофилла и биомассы. Сочетание НТР с высокопроизводительным генотипированием (HTG) позволяет проводить крупномасштабный скрининг селекционного материала с высокой скоростью и точностью [121].

1.5.3 Полногеномный ассоциативный анализ (GWAS) и мета-анализ QTL

Полногеномный ассоциативный анализ (GWAS, от англ. Genome-Wide Association Study) используется для поиска связи между молекулярными маркерами и фенотипическими признаками на панелях разнообразных сортов. Это повышает разрешающую способность картирования по сравнению с QTL-анализом. В исследовании с использованием панели из 431 сорта пшеницы идентифицировано 534 QTL, ассоциированных с 12 признаками NUE. С помощью интегративного мета-анализа найдены стабильные локусы. В этих регионах идентифицированы гены-кандидаты, в том числе представители семейства транскрипционных факторов bZIP и транспортер калия [124].

Мета-анализ QTL дает возможность выявлять консенсусные геномные регионы, контролирующие NUE независимо от генетического фона и условий окружающей среды. Такой подход особенно важен для пшеницы, которая

характеризуется сложным гексаплоидным геномом. Ранее проведенные мета-анализы выявили консервативные QTL-регионы на хромосомах 2A, 2B, 4B и 5A, которые ко-локализуются с генами фотопериодической чувствительности (*Ppd-A1*, *Ppd-B1*) и генами полукарликовости (*Rht-B1*, *Rht-D1*) [121].

1.5.4 Мультиомиксные подходы и редактирование генома

Мультиомиксные подходы, объединяющие геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику, открывают новые возможности для понимания сложных регуляторных сетей, контролирующих азотный обмен. Транскриптомный анализ с использованием RNA-Seq позволяет выявлять гены, экспрессия которых изменяется в ответ на изменение азотного питания, и идентифицировать ключевые регуляторы. Протеомные и метаболомные исследования позволяют получить информацию о пост-трансляционных модификациях и метаболических потоках, непосредственно отражающих функциональное состояние растения. В исследовании, проведенном на MAGIC-популяции озимой пшеницы показано, что различия в ответе на азотное питание между сортами связаны не столько с эффективностью поглощения азота, сколько с различиями в системах узнавания азота и регуляции C/N-метаболизма [125].

Редактирование генома с использованием системы CRISPR/Cas9 – перспективный инструмент для изучения регулирования азотной эффективности у растений. CRISPR/Cas9 позволяет вносить точечные изменения в геном, модифицируя регуляторные элементы или создавая новые аллели генов-мишеней. Модификации промоторных областей генов нитратных и аммонийных транспортеров (*NRT1.1*, *NRT2*, *AMT*), ферментов ассимиляции азота (*GS*, *GOGAT*), и транскрипционных факторов (*NLP*, *NAC*, *GRF*) позволяют оптимизировать уровень экспрессии целевых генов без изменения кодирующих последовательностей [121].

1.5.5 Геномная селекция и маркер-ориентированная селекция (MAS)

Геномная селекция удобна для признаков с низкой наследуемостью, таких как NUE, так как дает возможность прогнозировать фенотип образцов на основе их геномных профилей без необходимости фенотипирования в каждом поколении. Объединение геномной селекции с маркер-ориентированной селекцией (MAS, от англ. Marker-Assisted Selection) на основе стабильных QTL обеспечивает синергетический эффект, ускоряя накопление положительных аллелей в селекционном материале [121].

Современная селекция злаков на высокую NUE – комплексная стратегия, которая включает использование генетического разнообразия диких сородичей, передовые методы генотипирования и фенотипирования, мультиомиксные подходы для идентификации ключевых генов-мишеней, а также современные инструменты редактирования генома.

1.6 Сравнительная геномика злаков в контексте азотного обмена

Сравнительная геномика злаков нужна для понимания эволюционных основ азотного обмена и переноса знаний, полученных на модельных видах, на хозяйственно значимые культуры. Пшеница, рис, кукуруза, ячмень и сорго произошли от общего предка, жившего около 50–70 миллионов лет назад, и сохранили высокую степень коллинеарного расположения генетических локусов на хромосомах. Это позволяет использовать информацию о структуре и функции генов, полученную на одном виде, для предсказания и идентификации ортологичных генов у других злаков. Сходство геномной организации злаков послужило основой для создания концепции ortho-metaQTL, объединяющей мета-анализ количественных локусов с данными сравнительной геномики для выявления консервативных регионов, контролирующих эффективность использования азота.

Геномная структура злаков характеризуется дупликацией и полиплоидизацией. Это привело к расширению семейств генов, участвующих в азотном обмене. У риса с небольшим диплоидным геномом (около 430 Мб), найдено 13 генов высокоаффинных нитратных транспортеров *NRT2* и более 100 генов семейства *NPF*. У гексаплоидной пшеницы, геном которой содержит три гомеологичных субгенома (A, B, D), количество копий этих генов увеличилось втрое. Полиплоидизация привела к разделению и приобретению новых функций между гомеологами. Гены глутаминсинтетазы в разных субгеномах пшеницы демонстрируют различия между собой по тканеспецифичности, экспрессии и дифференциальному ответу на азотное голодание.

Исследования на пшенице, ячмене, рисе и кукурузе, показали, что субъединичная структура NADP-зависимой глутаматдегидрогеназы у этих видов идентична, а ферментный комплекс MDH-GOAT является эволюционно молодым образованием. Положительная корреляция активности этого комплекса с прорастанием семян отмечена у всех злаков, что говорит о том, что ферменты азотного обмена сохранили высокую структурную консервативность у злаков.

Благодаря сравнительному QTL-анализу идентифицировали консервативные геномные регионы, которые контролируют эффективность использования азота у разных злаков. Особенно хорошо изучен локус на длинном плече хромосомы 3В пшеницы, на котором расположен ген глутаматсинтазы (*GoGAT*). Этот локус находится в ортологичных позициях в геномах риса, сорго и кукурузы. Картирование выявило, что ген *GoGAT* и окружающие его регуляторные элементы сохранили коллинеарное расположение [78]. У риса ортологичный ген *OsNADH-GOGAT1* играет ключевую роль в реутилизации азота из стареющих листьев в зерновки. Его сверхэкспрессия увеличивает массу зерна до 80%.

У риса нитратный сенсор *OsNRT1.1B* образует комплекс с гетеромерными кальциевыми каналами *OsCNGC14* и *OsCNGC16*, а у арабидопсиса функционирует мономерный канал *AtCNGC15*. Такое различие отражает адаптацию риса к условиям затопления, где сигнальные пути могут нарушаться. Наличие гетеромерного комплекса обеспечивает надежность передачи сигнала. У пшеницы

и кукурузы, растущих в аэробных условиях, механизмы узнавания нитрата ближе к арабидопсисным.

Микросателлитные (SSR) маркеры, ассоциированные с QTL эффективности минерального питания, присутствуют у всех основных злаков, некоторые из них демонстрируют межвидовую консервативность. У пшеницы и ячменя обнаружены ортологичные QTL в гомеологичных хромосомных регионах [126], что говорит о существовании эволюционно стабильных генетических модулей, контролирующих азотный обмен. Эффективность использования элементов питания у злаков может различаться в 20 раз между крайними типами. Генотипы с наибольшей эффективностью часто представлены стародавними сортами, сохранившими аллели, утраченные в процессе современной селекции.

Эти регионы произошли от общего предкового хромосомного блока, который претерпел генные дупликации и делеции, инверсии хромосомных сегментов, транспозиции и инвазию повторяющихся элементов. Несмотря на эти перестройки, ядерные функциональные элементы остались консервативными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Растительный материал

2.1.1 Коллекция мягкой пшеницы

Для секвенирования генов *TaNLP3-3B*, *TaGRF9-6A*, *TaGRF9-6B*, *TaGRF9-6D*, *TaBT2-3A*, *TaBT2-3D*, *TaGS2-2A*, *TaNGR5-1D*, *TaAMT-2B*, использовались преимущественно сорта озимой мягкой пшеницы, предоставленной Национальным центром зерна имени П.П. Лукьяненко в Краснодаре (Васса, Гром, Сила, Паллада, Алексеич, Безостая 100, Зимтра, Ультра 11), сорт озимой пшеницы Ермак (Аграрный научный центр «Донской»), сорт яровой пшеницы Новосибирская 67 (ИЦиГ СО РАН), два сорта озимой тритикале Валентин 90, Мудрец (НЦЗ им. Лукьяненко). Также представлены сорта иностранной селекции: сорт озимой пшеницы Алтиго (Франция) и сорт яровой тритикале Дублет (Польша) (Таблица 1).

Таблица 1 – Образцы пшеницы и тритикале для секвенирования генов азотного обмена

Название	Вид	Тип развития	Страна происхождения	Регион происхождения
1) Алексеич	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
2) Алтиго	<i>T. aestivum</i>	озимая	Франция	-
3) Безостая 100	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
4) Ермак	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Ростов
5) Сила	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
6) Ультра 11	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
7) Васса	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
8) Зимтра	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
9) Паллада	<i>T. aestivum</i>	двуручка	Россия	Краснодар
10) Гром	<i>T. aestivum</i>	озимая	Россия	Краснодар
11) Новосибирская 67	<i>T. aestivum</i>	яровая	Россия	Новосибирск

Название	Вид	Тип развития	Страна происхождения	Регион происхождения
12) Валентин 90	<i>xTriticosecale</i>	озимая	Россия	Краснодар
13) Дублет	<i>xTriticosecale</i>	яровая	Польша	-
14) Мудрец	<i>xTriticosecale</i>	озимая	Россия	Краснодар

На этапе генотипирования использовалось 1182 образца пшеницы и тритикале, различного экологического и географического происхождения, собранные из коллекций, переданных нашими партнерами из ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, АО «Щёлково Агрохим». Вместе с образцами были предоставлены фенотипические данные, полученные на базе перечисленных организаций.

Коллекция из 408 образцов яровой и озимой пшеницы была передана из ФГБНУ «Омский аграрный научный центр».

В генотипирование включены 256 образцов из коллекции мягкой озимой пшеницы, а также 169 образцов тритикале, присланные из Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко в Краснодаре (акад. Беспалова Людмила Андреевна).

Из Федерального Исследовательского центра «Немчиновка» было предоставлено 76 образцов яровой пшеницы и 45 образцов пшеницы с Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Использовалось 132 образца озимой пшеницы, присланные из АО «Щёлково Агрохим».

Также были переданы 96 образцов, включая стандарты по регионам, по проекту Казахстанско-Сибирской сети по улучшению яровой пшеницы (КАСИБ).

2.1.2 Рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы и яровой тритикале

Для получения генотипических и фенотипических данных также использовались рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы и яровой тритикале. Данные популяции были созданы на технологической базе Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, путем многократного пересева популяций в поле с проверкой аллельного состояния молекулярными маркерами. Полевой опыт по выращиванию рекомбинантных инбредных линий пшеницы (F3:4; F4:5) и тритикале (F4:5; F5:6) производился в 2018 и 2019 годах в условиях Москвы и Краснодарского края. Метеорологические условия проведения полевого опыта указаны в Приложении А.

Ниже представлена схема скрещиваний с указанием аллельных вариантов генов для пшеницы и тритикале, установленных на этапе генотипирования:

♀(озим.) линия пшеницы Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Ppd-D1a*, *TaGS2-2Ab*, *pAMT-2Bb*, *BT2-3Aa*, *NLP3-3B(G)*, *GRF9-6B(C)*) ×

♂(яр.) пшеница PI 518620 (*Rht-B1b*, *Ppd-D1b*, *TaGS2-2Aa*, *pAMT-2Ba*, *BT2-3Ab*, *NLP3-3B(A)*, *GRF9-6B(T)*), – семена родительских линий предоставлены профессором Нобуёси Ватанабэ (Университет Сельского хозяйства, Ибараки, Япония). В поколении F5:6 было получено 3595 растений.

♀(озим.) тритикале Хонгор (*Ddw1*, *GRF9-6A-12a*) ×

♂(яр.) тритикале Дублет (*ddw1*, *GRF9-6A-12b*); – семена родительских сортов тритикале предоставлены из НИЦЗ имени П.П. Лукьяненко, Краснодар. В поколении F5:6 было получено 2717 растений.

2.2 Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК выполняли СТАВ-методом [127] из лиофилизированных листьев и 4-дневных проростков. Зерна проращивали в

чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в термошкафу при 25 °С. Работу вели в 96-луночных титр-планшетах, устанавливаемых в штативы. В каждую лунку помещали фрагмент сухого листа длиной около 2,5 см, после чего материал измельчали в гомогенизаторе TissueLyser II (Qiagen, Нидерланды) с использованием стальных шариков диаметром 4 мм. К полученной массе добавляли 540 мкл предварительно подогретого до 60 °С лизирующего буфера на основе СТАВ ($\times 1$) и энергично перемешивали содержимое планшетов.

Планшеты инкубировали на водяной бане при 65 °С в течение 1 часа, встряхивая вручную каждые 15 минут. После инкубации планшеты охлаждали до комнатной температуры и вносили по 360 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1. Содержимое перемешивали медленным переворачиванием штатива вручную на протяжении 15 минут, затем центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре (центрифуга LMC-4200R, BioSan, Латвия).

Из каждой лунки отбирали 300 мкл надосадочной жидкости (супернатанта) многоканальной пипеткой и переносили в чистые планшеты. К супернатанту добавляли 360 мкл изопропанола, предварительно охлаждённого до -20 °С. Планшеты несколько раз перемешивали переворачиванием и помещали в морозильную камеру при -20 °С на 20 минут. Затем осаждение продолжали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 50 минут при +4 °С. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, а верхнюю часть лунок осушали фильтровальной бумагой.

К полученному осадку добавляли 150 мкл 70% этанола и центрифугировали планшеты 10 минут при 2000 об/мин при комнатной температуре. Этанол сливали, остатки жидкости удаляли фильтровальной бумагой. После завершения очистки планшеты помещали в вакуумный концентратор Concentrator plus (Eppendorf, Германия) на 15 минут при 45 °С для подсушивания. Высушенную ДНК растворяли в 150 мкл стерильной воды и хранили при +4 °С.

ДНК выделяли также из размолотого зерна с использованием автоматической выделительной станции AutoPure 96 (AlSheng, Китай) с коммерческим набором МагноПрайм ГМО (ООО «НекстБио», Россия) реактивов для выделения ДНК. Зерно измельчали в гомогенизаторе (TissueLyser II) с помощью стальных цилиндров и шарика из нержавеющей стали. После отдельные пробирки отбирали 10 мг муки. Далее выделение проводили в соответствии с протоколом, указанным в инструкции к набору для выделения. Полученный раствор ДНК в элюирующем буфере отбирали в титр-трубки и помещали на хранение в холодильник (+4°C).

2.3 Подбор праймеров для амплификации и секвенирования генов

Номера записей нуклеотидных последовательностей генов в базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) или идентификаторы генов в аннотации генома пшеницы IWGSC RefSeq1.0 (<https://www.wheatgenome.org/>) были найдены в литературных источниках. Последовательности генов и их фланкирующих регионов, необходимые для подбора праймеров, были найдены в референсном геноме пшеницы IWGSC RefSeq1.0 по идентификатору, либо с помощью поиска BLAST. В связи с аллополиплоидной природой пшеницы мягкой и тритикале, и сосуществования в составе их генома трёх субгеномов (В, А и D – для пшеницы мягкой; А, В и R – для гексаплоидной тритикале), происходящих от родственных видов злаков, при подборе специфичных праймеров важно учитывать наличие гомеологов. Гомеологи каждого гена, относящиеся к другим субгеномам, были найдены по информации, содержащейся в аннотации генома, либо с помощью BLAST-поиска.

Подбор специфичных праймеров для амплификации фрагментов генов для последующего секвенирования осуществлялся одним из двух способов.

Способ 1. Последовательности гена и его гомеологов были выравнены в программе GeneDoc2.7 [128]. Подбор субгеном-специфичных праймеров осуществлялся с помощью онлайн-сервиса Primer-BLAST NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Настройки Primer-BLAST отличались от стандартных: для проверки специфичности праймеров использовалась база данных неизбыточных последовательностей (nr) для рода *Triticum*, минимальная длина праймера составляла 20 нуклеотидов, а оптимальная – 23 нуклеотида. Проверка специфичности праймеров проводилась также путем визуализации их на выравнивании гомеологов из трех субгеномов. Праймеры подбирались таким образом, чтобы длина единичного ПЦР-продукта не превышала 2500 пар оснований, чтобы ПЦР-продукты перекрывались друг с другом и охватывали вместе всю последовательность гена и, если это возможно, по 500 пар оснований фланкирующих последовательностей с каждого конца.

Способ 2. Подбор праймеров осуществлялся автоматически, с помощью пакета программ, основу которого составляет программа Primer3 (<https://primer3.org/>). Пакет программ выполнял действия по следующему алгоритму [129]:

- По идентификатору целевого гена в аннотации генома пшеницы IWGSC RefSeq1.0 находятся идентификаторы гомеологов целевого гена.
- По идентификаторам генов находится информация об их положении в референсном геноме. Координаты генов используются для вырезания их последовательностей из последовательностей хромосом.
- Во избежание подбора праймеров, комплементарных повторяющимся элементам генома на последовательность целевого гена, к которой подбираются праймеры, накладывается «маска» (перевод прописных букв в строчные) в соответствии с аннотацией транспозонов генома пшеницы, а во входных данных для работы программы Primer3 указывается параметр «PRIMER_LOWERCASE_MASKING=1».
- В последовательности целевого гена проводится поиск коротких tandemных повторов (микросателлитов), чтобы исключить возможность подбора праймеров на их регионы.
- На вход Primer3 подается последовательность целевого гена (параметр SEQUENCE_TEMPLATE), а также последовательности генов-гомеологов, к

которым подбираемые праймеры не должны быть комплементарны (через параметр PRIMER_MISPRIMING_LIBRARY). Проводится поиск пар праймеров, дающих ПЦР-продукты размерами от 500 до 2500 пар оснований ко всем возможным регионам целевого гена с интервалами в 100 пар оснований.

- Из общего набора полученных пар праймеров производится выбор наименьшего набора пар, перекрывающих ПЦР-ампликонами целевую последовательность полностью, со взаимным перекрытием не менее 50 пар оснований и минимальной суммарной длиной всех ампликонов.

При этом амплификация генов по фрагментам, размер которых не более 2500 пар оснований сокращает время, требуемое для протекания полимеразной цепной реакции (меньшее время элонгации), и повышает вероятность получения результата без необходимости длительного этапа оптимизации условий реакции.

2.4 NGS-секвенирование ампликонов

Соответствие размеру и качество ампликонов проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле (здесь можно добавить картинки форефов). После электрофоретического контроля для каждого гена у каждого сорта ампликоны объединяли в пул в равных объёмах, без индивидуальной очистки и нормализации концентрации. Объединённые ампликоны фрагментировали, репарировали концы и лигировали баркодные линкеры, специфичные для сорта. Баркодированные препараты разных сортов объединяли, отбирали фрагменты больше 200 п.н. и готовили ДНК-библиотеки с использованием набора Swift 2S Turbo DNA Library Kits. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (Illumina Inc., США) в компании «Геномед». После секвенирования прочтения сортировали по баркодам и для каждого сорта отдельно собирали полноразмерные последовательности гена.

2.5 Картирование прочтений и выявление полиморфизмов

Качество полученных прочтений было оценено с помощью программы FastQC [130] и оказалось достаточным для дальнейшей работы. Для картирования коротких прочтений на референс использовалась программа SNAP (Scalable Nucleotide Alignment Program) v1.0 [131]. Для обработки полученного выравнивания, выявления полиморфизмов и построения последовательности секвенированного аллеля путем внесения изменений в референсную последовательность, использовались программы freebayes [132] и bcftools 1.10.2 [133]. Визуализация выравнивания прочтений на референс осуществлялась с помощью программы IGV 2.8.2 [134]. Выравнивание секвенированных последовательностей и последовательности референсного генома пшеницы сорта Chinese Spring (RefSeq1.0) было выполнено в GeneDoc 2.7. Границы белок-кодирующей последовательности (CDS) были установлены путем её выравнивания с геномной последовательностью. Трансляция нуклеотидной последовательности в аминокислотную проводилась в GeneDoc 2.7. Для оценки потенциального влияния обнаруженных несинонимичных замен на функцию белка использовали программу PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer), в которой варианты со значением PROVEAN score $\leq -2,5$ прогнозируются как повреждающие функцию белка, а варианты с оценкой выше порога – как нейтральные.

2.6 Фенотипирование

Мы фенотипировали образцы, относящиеся к рекомбинантным инбредным линиям. Для каждого растения регистрировали следующие фенотипические признаки (все параметры колоса измеряли на главном колосе): высота растения (ВР, см), длина колоса (ДК, см), число колосков в колосе (ЧКК), плотность колоса (ПК, рассчитываемая как десятикратное отношение ЧКК к ДК), масса зерна с одного колоса (МЗК, г), число зёрен в колосе (ЧЗК), масса зерна в колоске (МЗКол,

г), масса тысячи зёрен (МТЗ, рассчитываемая как частное от деления МЗК на ЧЗК, умноженное на 1000, г), число продуктивных побегов (ЧПП), число междоузлий (ЧМ), дата колошения (ДКол, дней после посева), дата цветения (ДЦв, дней после посева), индекс урожайности (ИУ), длина цветоноса (первое междоузлие под колосом, см), длина второго верхнего междоузлия (см), длина третьего верхнего междоузлия (см), длина четвёртого верхнего междоузлия (если имеется, см), длина второго нижнего междоузлия и длина первого нижнего (самого нижнего) междоузлия (см). Индекс урожайности рассчитывали как отношение массы зерна главного колоса к суммарной массе необмолоченного колоса и цветоноса. Фазы цветения и колошения определяли визуально для всей семьи (семейства) растений. Семена подсчитывали с помощью приложения SeedCounter [135].

Фенотипические данные для коллекций сортов получены в производственных и селекционных питомниках организаций-партнёров на едином для каждого опыта фоне питания; азотный фон в опытах не варьировали, содержание азота в органах растения и показатели эффективности использования азота не определяли. Поэтому выводы работы относятся к вкладу изученных аллельных вариантов в хозяйственно-ценные признаки, но не к их вкладу в эффективность использования азота как таковую. Проверка последней составляет самостоятельную задачу и намечена в перспективах исследования.

2.7 Генотипирование

Генотипирование выполняли с помощью полимеразной цепной реакции. От каждого образца, входящего в исследуемые коллекции, анализировали по два растения; для семей рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) число проанализированных растений увеличивали до трёх на семью. Для оценки генетической однородности и подтверждения сортовой принадлежности проводили ПЦР-анализ смешанного образца, включавшего 30 растений.

Для идентификации аллелей гена *Rht17* у линий яровой мягкой пшеницы, полученных от скрещивания Chris Mutant × PI518620, применяли маркер Rht-B1p, разработанный ранее [136].

Определение аллельного состояния по гену *Ppd-D1* проводили с использованием маркера Ppd-D1 [137].

Для проведения ПЦР реакции и считывания сигнала флуорофоров для KASP-маркеров использовали термоциклер CFX-96 (BioRad, США) с встроенным программным обеспечением. Для постановки конкурентной аллель-специфичной ПЦР предварительно подготавливали смесь праймеров. Каждый из праймеров разводили до концентрации 50 пМ/мкл и смешивали в объемном соотношении: 1 часть А + 1 часть В + 2,5 части С.

Наличие на хромосоме 1В ржаной транслокации 1RS.1BL определяли с помощью маркера SCM9 [138].

Для проведения ПЦР реакции с обычными маркерами использовали термоциклер T100 (BioRad, США). Полученные ПЦР-продукты проверяли методом электрофореза в агарозном геле с визуализацией с помощью прибора GelDoc XR+ System (BioRad, США). При постановке ПЦР параллельно с образцами ставились положительные контроли для каждого детектируемого аллеля и вода в качестве отрицательного контроля.

Аллельное состояние по гену *Ddw1* определяли с помощью праймеров, комплементарных микросателлитной последовательности REMS1218 [13], с последующим фрагментным анализом. Фрагментный анализ продуктов амплификации REMS1218 выполняли на ДНК-анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, Life Technologies, США).

Разработанные нами маркеры.

Для детекции однонуклеотидного полиморфизма во втором экзоне гена *TaPARG-2A* (с.793C>T), характерного для сортов Norin 61 и Chinese Spring, использовали подобранный нами на основе выравнивания геномов мягкой пшеницы из IWGSC RefSeq1.0 KASP-маркер cPARG-2A.

Для детекции однонуклеотидного полиморфизма в четвертом интроне гена *TaNLP3-3B* (с.1824+137G>A) разработан гомеолог-специфичный маркер NLP3-3B.

Для детекции однонуклеотидного полиморфизма в гене *TaGRF9-6B* (с.1155C>T), который встречается у сортов Алтиго, Ермак, Новосибирская 67 и представляет собой синонимичную замену кодона, разработан аллель-специфичный маркер.

Для детекции делеции размером 12 пар нуклеотидов в промоторе гена *TaGRF9-6A*, которая обнаружена у сорта тритикале Дублет, использовали разработанный нами субгеном-специфичный маркер GRF9-6A-12del.

Для детекции делеции размером в 60 пар нуклеотидов в интроне гена *TaBT2-3A*, которая выявлена у сортов Cadenza, Julius, Urartu, использовали подобранный нами на основе выравнивания геномов мягкой пшеницы из IWGSC RefSeq1.0 маркер BT2-3A.

Для детекции делеции 10 пар нуклеотидов в промоторе генов *TaGS2-2A* использовали разработанный нами маркер pGS-2A.

Для детекции indel длиной 4 пары нуклеотидов на расстоянии 570-573 пары нуклеотидов от сайта начала транскрипции в гене *TaNGR5-1B* использовали маркер pNGR5-1B, подобранный нами на основе выравнивания геномов мягкой пшеницы из IWGSC RefSeq1.0.

На обнаруженную при амплификации фрагментов гена *TaAMT-2B* делецию размером 160 пар нуклеотидов у сорта Алексеич разработали маркер pAMT-2B.

Последовательности праймеров, использованные программы ПЦР и состав реакционной смеси описаны в Приложении Б. Валидация разработанных маркеров проводилась на основе ДНК секвенированных сортов.

2.8 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica 12.5 (StatSoft Inc., США) и библиотек Python 3 (matplotlib, pandas, statsmodels). Для всех анализов использовали только гомозиготные растения по анализируемым маркерам.

Для оценки влияния генов и их взаимодействия на количественные признаки применяли дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием общей линейной модели (GLM). Статистическая модель включала основные фиксированные эффекты генотипа по исследуемым генам, года, места проведения опыта, а также все возможные взаимодействия между этими факторами. Для установления нового уровня значимости при множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони. После подтверждения значимости F-критерия в ANOVA проводили парные post-hoc сравнения взвешенных средних с использованием критерия наименьшей существенной разности (НСР) Фишера при уровне значимости $p < 0,05$.

Нормальность распределения каждого признака оценивали визуально с помощью гистограмм. Для признаков с распределением, близким к нормальному, данные фильтровали с использованием границы, равной трём медианным абсолютным отклонениям (three-median absolute deviation). Нормальность остатков после применения модели проверяли с помощью квантиль-квантиль графиков. Для признака «масса зерна на растение», распределение которого не соответствовало нормальному, применяли преобразование натурального логарифма.

Для признаков «число колосков в колосе», «число продуктивных побегов», «число междоузлий», «дата колошения» и «дата цветения» использовали непараметрический χ^2 -критерий для проверки независимости распределения растений по классам генотипов и фенотипов. Для выявления статистически значимых различий между группами генотипов применяли U-критерий Манна –

Уитни. Полученные р-значения корректировали с помощью процедуры контроля ложных обнаружений (FDR) Бенджамини – Хохберга при уровне $FDR = 0,05$.

Для визуализации распределения признаков в группах генотипов строили ящичковые диаграммы (box plots) в комбинации со «скрипичными» диаграммами (violin plots) и точечными диаграммами (scatter plots). Однородные группы на графиках выделяли на основе скорректированных р-значений ($FDR = 0,05$).

Ассоциативный анализ с оценкой статистической значимости проводили только для коллекций, у которых был достаточный объём выборки для каждой генотипической группы. Для коллекций с малым числом образцов или отсутствием сопутствующих фенотипических данных расчёт статистических критериев не проводили ввиду недостаточного объема выборки и высокого риска получения ложноположительных результатов. В таких случаях ограничивались оценкой частот встречаемости аллелей и описанием аллельного состава коллекций.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Молекулярно-генетический анализ гена *TaPARG-2A*

3.1.1 Секвенирование гена *TaPARG-2A*

Для амплификации гена *TaPARG* на хромосоме 2A у 14 сортов были подобраны 5 пар праймеров (Таблица 2). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкрирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 1. Структура гена включает 8 экзонов и 7 интронов. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомологичных генов (*TaPARG-2B* и *TaPARG-2D*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство подтверждает их филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 2 – Праймеры, подобранные на последовательность гена PARG-2A

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaPARG-2A-1F	GTTCTACACAGATCCCAAGCTGG	61	1657
	TaPARG-2A-1R	GCATGAACACGTAGTAGTACCCA	60	
2	TaPARG-2A-2F	TTAGCCGGGCAAGAAGTAGAG	60	705
	TaPARG-2A-2R	CCGTTACACACATCACGAAA	59	
3	TaPARG-2A-3F	CTTGTTGGGGAGTGTGTGGT	60	1744
	TaPARG-2A-3R	ATGACGTCCTGGTTTCGGTG	60	
4	TaPARG-2A-4F	GTGAGTGACGCAGATGGTGT	60	1639
	TaPARG-2A-4R	CTCACGGGAGTACATCGCAG	60	
5	TaPARG-2A-5F	GGATATGTACCAAGCCCAGCAT	60	525

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	T _m , °C	Длина ампликона, п.н.
	TaPARG-2A-5R	GCACGCAACAGATCAACTAACTG	61	

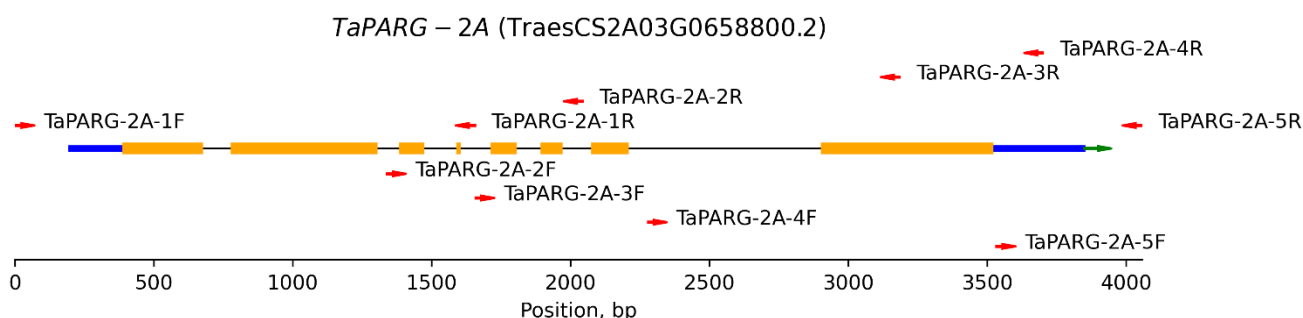


Рисунок 1 – Расположение подобранных праймеров и экзон-инторонная структура гена *TaPARG-2A* (TraesCS2A03G0658800.2).

3.1.2 Полиморфизмы гена *TaPARG-2A*

Нам удалось идентифицировать несколько полиморфизмов. В 5'-нетранслируемой области 1-го экзона нами был обнаружен полиморфизм с.-117T>C у большинства образцов, кроме образцов пшеницы Ермак и Паллада. Также у большинства сортов, кроме Ермак и Паллада, присутствовал полиморфизм с.*215C>A в 3'-нетранслируемой области и однонуклеотидные полиморфизмы в межгенной области хромосомы chr2A:g.428 911 939C>T и chr2A:g.428 912 023T>C, которые могут нарушать регуляцию экспрессии генов. Таким образом, у образцов Ермак и Паллада присутствовал аллель, сходный с аллелем референсного генома Chinese Spring, в то время как у большинства остальных образцов присутствовал отличающийся аллель.

Во 2-м экзоне гена *TaPARG-2A* обнаружена нуклеотидная замена с.793C>T. Большинство образцов несло аллель «T», и лишь сорт Ермак нёс аллель «C», сходный с аллелем референсного сорта Chinese Spring. Данный полиморфизм предположительно приводит к замене аминокислоты в кодируемом белке р.(His265Tyr). При этом вариант белка с аллелем «C» по прогнозу PROVEAN [139],

вероятно нефункционален (PROVEAN score = -4,749). Этот полиморфизм был ранее описан как ключевой для гаплотипов Нар-2А-2 и Нар-2А-3 гена пшеницы *PARG* на хромосоме 2А. Хотя сверхэкспрессия этого гена у риса приводила к увеличению кущения и снижению продуктивности [7], гаплотипы Нар-2А-2 и Нар-2А-3 с аллелем «Т», дающим функциональный белок, широко распространены среди китайских сортов пшеницы и благоприятно влияют на хозяйственно-ценные признаки. В том числе, Нар-2А-2 и Нар-2А-3 были ассоциированы с меньшей высотой растений, меньшей кустистостью и большей массой 1000 зерен [7,8]. Можно предположить, что и в нашем исследовании у большинства сортов присутствовал один из ценных гаплотипов (Нар-2А-2 или Нар-2А-3), несущих полиморфизм с.793С>Т.

3.1.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaPARG-2A*

На найденный нами во 2-ом экзоне полиморфизм с.793С>Т был разработан KASP-маркер. В качестве праймеров подобраны нуклеотидные последовательности, перечисленные в таблице 3. Длина ампликона была 56 п.н. Обратные праймеры TaPARG-2A-A и TaPARG-2A-B специфичны А-субгеному мягкой пшеницы, общий прямой праймер не специфичен для субгенома А и амплифицируется со всех трех субгеномов мягкой пшеницы.

Таблица – 3 Последовательности праймеров на полиморфизм с.793С>Т в гене *TaPARG-2A*

Название	Тип праймера	Хвост праймера	Последовательность праймера	Аллели
cPARG-2A-A	Прямой-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT	CCTGGTGACGCCACGGTA	T
cPARG-2A-B	Прямой-HEX	GAAGGTCGGAGTCAACGGATT	CCTGGTGACGCCACGGTG	C
cPARG-2A-C	Обратный	-	GCAAGTCCATCGACACGTTC	-

Маркер был апробирован, сорт Chinese Spring, ожидаемо отличался, у него был детектирован аллель «С» в то время, как у других пшениц амплифицировался аллель «Т» (Рисунок 2).

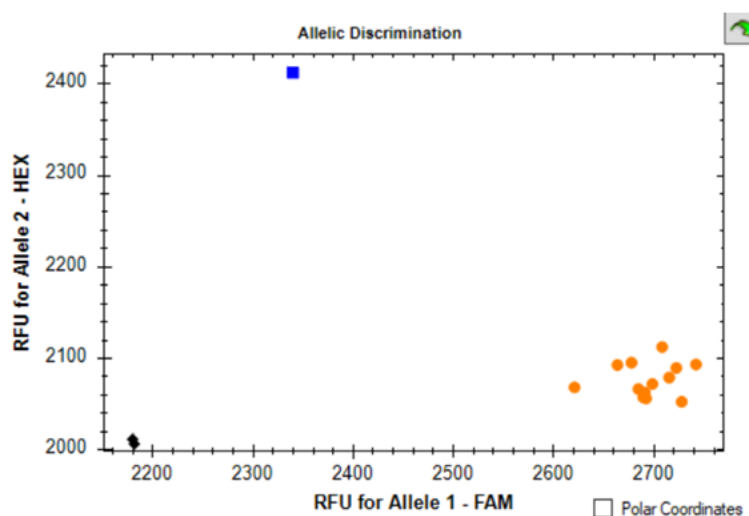


Рисунок 2 – Диаграмма результатов KASP-генотипирования по однонуклеотидному полиморфизму *TaPARG-2A*: с.793C>T. Синий квадрат – сорт пшеницы Chinese Spring, несущий аллель «С»; оранжевые круги – сорта Васса, Алтиго, Сила, Новосибирская 67, несущие аллель «Т»; черный ромб – отрицательный контроль (вода).

3.1.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaPARG-2A* с хозяйственно-ценными признаками

После апробации на разработанный KASP-маркер были проанализированы 636 образцов пшеницы из коллекций предоставленных ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», АО «Щёлково Агрохим», КАСИБ и 169 образцов тритикале из Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко. Среди изученных сортов выявлены сорта пшеницы, несущие аллель «С»: Ермак, Jerry, Akord, а также селекционный образец тритикале 0-113t12. Процент встречаемости данного аллеля в анализируемых коллекциях составляет всего 0,5%.

Прогноз PROVEAN (score = -4,749) указывает на нарушение функциональности белка у образцов с аллелем «С». Сверхэкспрессия гена *TaPARG* у риса привела к снижению высоты растения, уменьшению скорости завязывания

семян и уменьшению массы 1000 зерен и увеличению кущения [7]. С другой стороны, гаплотипы Нар-2А-2 и Нар-2А-3, несущие замену с.793С>Т, то есть аллель «Т» с нормальной функциональностью белка, описаны как широко распространённые и благоприятные по высоте растения, кустистости и массе 1000 зёрен [7,8]. В настоящей работе фенотипические данные по носителям аллеля «С» отсутствуют: все четыре образца происходят из коллекций, для которых сравнение генотипических классов по признакам продуктивности невозможно из-за крайне низкой частоты аллеля, поэтому вопрос о направлении и величине эффекта с.793С>Т у мягкой пшеницы остаётся открытым.

Низкая частота аллеля «С» в изученных коллекциях согласуется с гипотезой о его вытеснении в ходе селекции, однако сама по себе не отличает отбор от особенностей происхождения исходного материала. Практическое значение полученного результата состоит в том, что разработанный KASP-маркер позволяет вести целенаправленный поиск носителей потенциально ценного аллеля: в изученных коллекциях они единичны.

3.2 Молекулярно-генетический анализ гена *TaPARG-2B*

3.2.1 Секвенирование гена *TaPARG-2B*

Для амплификации гена *PARG* на хромосоме 2В у 14 сортов нами было подобрано 6 пар праймеров (Таблица 4). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 3. Структура гена включает 8 экзонов и 7 интронов. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомологичных генов (*TaPARG-2A* и *TaPARG-2D*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство подтверждает их

филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 4 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *PARG-2B*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaPARG-2B-1F	ACATATAGAGGAGAGCAGCTCA	58	604
	TaPARG-2B-1R	GCGCTGAAGTACGTACCGTT	61	
2	TaPARG-2B-2F	CCTACTTCCTCTTGCCCCATC	60	1823
	TaPARG-2B-2R	CCGTTACACGCAGATCACAAG	60	
3	TaPARG-2B-3F	TCGGGGAAAGAAGTAGAGCA	58	1186
	TaPARG-2B-3R	ACACGCATACATGTGGAAGG	58	
4	TaPARG-2B-4F	GTCACAGCTCACAGCCACTC	61	1289
	TaPARG-2B-4R	CCGTGGGCTTGGTACATATCA	60	
5	TaPARG-2B-5F	ATGCGTGTGTGTATGGTCCTG	61	1530
	TaPARG-2B-5R	ACGCTACCAGCCCTATTATTTCAG	60	
6	TaPARG-2B-6F	ACGATGTAAGATCGAGGAAATGC	59	518
	TaPARG-2B-6R	AATCTACCGATTTCAGGTTCCGTC	60	

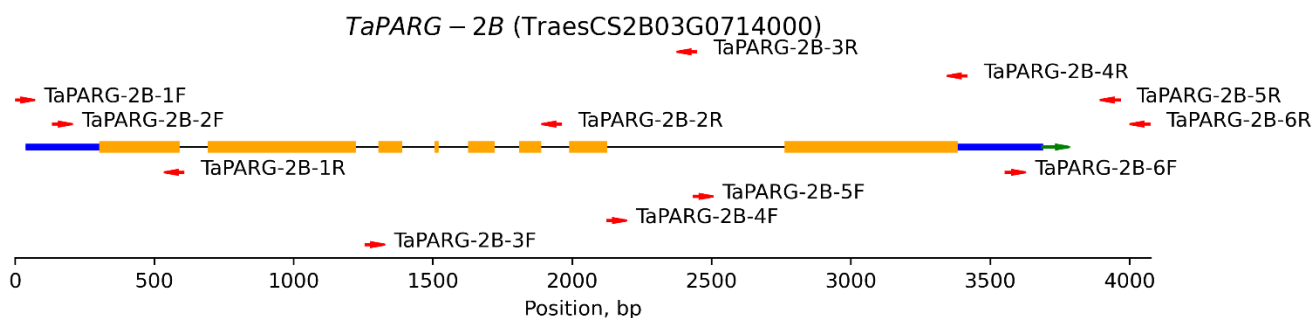


Рисунок 3 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaPARG-2B* (TraesCS2B03G0714000)

3.2.2 Полиморфизмы гена *TaPARG-2B*

В секвенированной последовательности гена не было обнаружено значимых отличий от референсной последовательности у сорта Chinese Spring, за

исключением вариации длины микросателлита в шестом, последнем, интроне гена (Рисунок 4), которая может вызвать нарушение сплайсинга РНК. Основным мотивом повтора является динуклеотидная последовательность “СТ”. Всего нами было найдено 4 варианта микросателлитного локуса: вариант А (82 п. н.) – у образцов Ермак, Гром, Новосибирская 67, Паллада, Васса и Зимтра; вариант В (80 п. н.) – у образцов Алексеич, Безостая 100, Ультра 11 и Chinese Spring; вариант С (82 п. н.) – у образца Алтиго и вариант D (78 п. н.) – у образца Сила.

		*	20	*	40	*	60	*	80	
Alekseich_1-8	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	80	
Altigo_9-17	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	CT	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Bezostaya_100_18-24	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	80	
Ermak_25-31	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Grcm_32-39	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Novosibirskaya_67_40	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Pallada_47-54	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Sila_55-62	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-----	TCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	78	
Ultra_11_63-69	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	80	
Vassra_70-75	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
Zimtra_76-82	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	82	
chr2B	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	80	
TraesCS2B02G268100	:		CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACACACACAAATATCTCATTTCTCTCTC	--	TCTCTCT	:	80	
exons	:		-----		-----		-----		-----	:
CDS	:		-----		-----		-----		-----	:
	:		ctctctctctctctctctctctctctct		ctctctctctctctctctctctctctacacacacaaatctcattctctctctc		tctctct			:

Рисунок 4 – Вариация длины микросателлита в 6-ом интроне гена *TaPARG-2B*.

3.3 Молекулярно-генетический анализ гена *TaPARG-2D*

3.3.1 Секвенирование гена *TaPARG-2D*

Для амплификации гена *PARC* на хромосоме 2D у 14 сортов нами были подобраны 4 пары праймеров (Таблица 5). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 5. Структура гена включает 8 экзонов и 7 интронов. В секвенированной последовательности гена *TaPARC-2D* не было обнаружено отличий от референсной последовательности пшеницы Chinese Spring. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомеологичных генов (*TaPARC-2A* и *TaPARC-2B*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство подтверждает их

филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 5 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *PARG-2D*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaPARG-2D-1F	GTTCGCGTGTCAATGTATTCA	57	1733
	TaPARG-2D-1R	CGACGGAGGAAATATGTGTGT	58	
2	TaPARG-2D-2F	TCCTCCTACTTCTTCTTCTTCTTG	57	2235
	TaPARG-2D-2R	ACACACATGAGGGAGGAGAGAG	61	
3	TaPARG-2D-3F	TGATTCTCCTCTCCCTGCCA	60	1505
	TaPARG-2D-3R	CAGTAAGATGCACGTTTTGATCGA	60	
4	TaPARG-2D-4F	CTCCTGCGACTTAAGATCGAAGA	60	1013
	TaPARG-2D-4R	GAGCATCTAGTTCTTGCAAACCA	59	

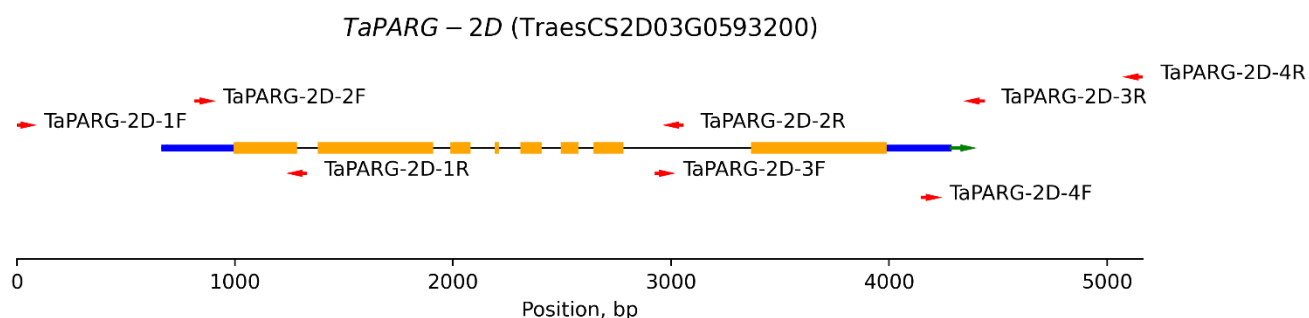


Рисунок 5 – Расположение подобранных праймеров и экзон-инторонная структура гена *TaPARG-2D* (TraesCS2D03G0593200)

3.4 Молекулярно-генетический анализ гена *TaNLP3-3B*

3.4.1 Секвенирование гена *TaNLP3-3B*

Для секвенирования гена-гомолога *NLP3* у 14 сортов, локализованного на хромосоме 3В и обозначенного нами как *TaNLP3-3B*, были подобраны 8 пар праймеров (Таблица 6). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали

целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 6. Структура гена включает 5 экзонов и 4 интрона.

Таблица 6 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *NLP3-3B*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaNLP3-3B-F1	TGACAATGTAACCAAACACGCTC	60	1189
	TaNLP3-3B-R1	TAAACATCCCGTGCGATCCA	59	
2	TaNLP3-3B-F2	GACAAAAACACATCGCCCACTTG	61	1554
	TaNLP3-3B-R2	AGCACGGCAAAGTACATATCATTG	60	
3	TaNLP3-3B-F3	ATTAGTGCGGACAAGCCTGG	60	2285
	TaNLP3-3B-R3	TTTCACCTTCGGGCGATTCA	60	
4	TaNLP3-3B-F4	TGCCCTTGATTGATGATAGAATG	59	2396
	TaNLP3-3B-R4	ATGGTGTCATGACTTCAACAGGA	60	
5	TaNLP3-3B-F5	GATGGCCCCACTTACCTTGG	60	1136
	TaNLP3-3B-R5	TTCCCCGGAGTCATCTCTTGT	61	
6	TaNLP3-3B-F6	GTTCTGTGGAAGTCATGACACC	60	1024
	TaNLP3-3B-R6	CATTGTCCTACGGCTGGTCG	61	
7	TaNLP3-3B-F7	TCGGGGTTCGACTGTTGGATA	61	1672
	TaNLP3-3B-R7	AGGTTTTTCCTAGTGGTGCACA	60	

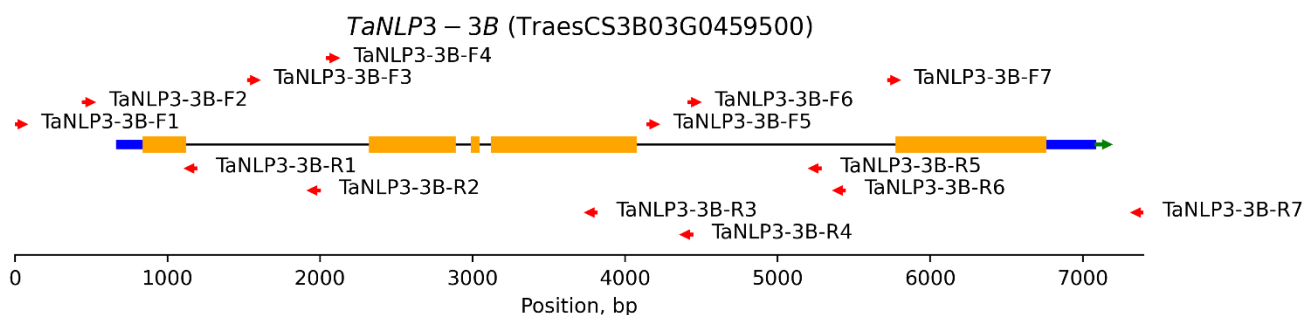


Рисунок 6 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaNLP3-3B* (TraesCS3B03G0459500)

3.4.2 Полиморфизмы гена *TaNLP3-3B*

В самом гене нами было выявлено 3 полиморфизма. У всех исследованных нами образцов пшеницы наблюдалось отличие от референсного генома Chinese Spring в форме однонуклеотидной замены в белок-кодирующей области: с.234Т>С. Однако данная замена не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка ввиду синонимичности кодонов. В 4-ом интроне присутствует вариативный среди исследованных сортов полиморфизм с.1824+137G>А, а в 3'-некодирующей области гена присутствует полиморфизм с.*245А>Т. Хотя оба полиморфизма не меняют аминокислотную последовательность белка, они могут повлиять на регуляцию экспрессии гена и сплайсинг.

В межгенном пространстве рядом с 3'-концом гена имеются ещё 2 SNP: chr3B:g.202 930 660C>Т у всех секвенированных нами образцов (по отношению к Chinese Spring) и chr3B:g.202 930 918Т>С у некоторых образцов.

С помощью обнаруженных нами полиморфизмов можно выявить 3 аллеля (гаплотипа) гена *TaNLP3-3B*. Аллель обозначенный нами буквой *a* встречается у сортов пшеницы Алексеич, Ермак, Паллада, Сила и Васса; аллель *b* – у сортов Алтиго, Безостая 100, Гром, Новосибирская 67, Ультра 11 и Зимтра; и аллель *c* – в референсном геноме пшеницы Chineses Spring.

3.4.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaNLP3-3B*

Для детекции полиморфизма с.1824+137G>A в гене *TaNLP3-3B* был разработан конкурентный аллель-специфичный ПЦР-маркер (KASP). На основании выравнивания нуклеотидных последовательностей гомеологов были подобраны два аллель-специфичных прямых праймера с 3'-концами, комплементарными вариантам G и A, и один общий обратный праймер. К 5'-концам аллель-специфичных праймеров были добавлены универсальные хвосты для связывания с флуоресцентными зондами FAM и HEX (Таблица 7). Специфичность маркера к В-субгеному подтверждена с помощью BLAST-анализа и ПЦР на контрольных образцах.

Таблица 7 – Последовательности праймеров KASP-маркера на полиморфизм в гене *TaNLP3-3B*

Название	Тип праймера	Хвост праймера	Последовательность праймера	Аллели
NLP3-3B	Прямой-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT	CTAGTCCTCTTGAATATGGATATCAA	A
	Прямой-HEX	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATT	CTAGTCCTCTTGAATATGGATATCAG	G
	Обратный	-	ACATTTTGTTGCCATTTAAGCCC	-

По результатам секвенирования, вариант «G» однонуклеотидного полиморфизма с.1824+137G>A встречается у сортов Алексеич, Ермак, Паллада, Сила, Васса, Chinese Spring, а вариант «A» у сортов Алтиго, Безостая 100, Гром, Новосибирская 67, Ультра 11 и Зимтра. Эти данные позволили успешно валидировать результаты генотипирования, полученные нами с помощью разработанного KASP-маркера (Рисунок 7).

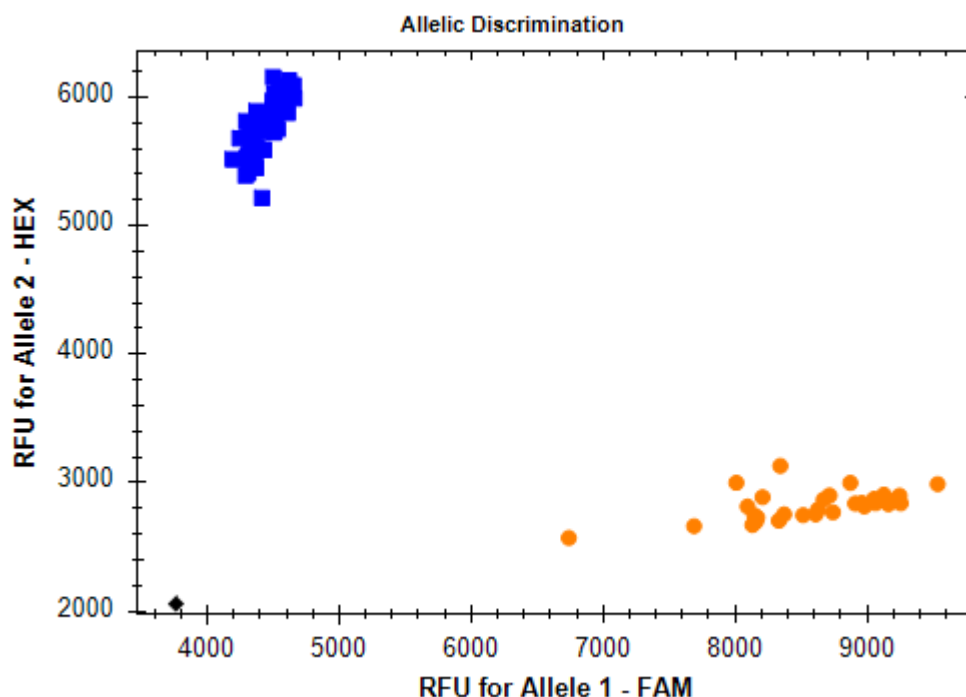


Рисунок 7 – Диаграмма результатов KASP-генотипирования по однонуклеотидному полиморфизму *TaNLP3-3B*: с.1824+137G>A. Синие квадраты – образцы, несущие аллель «G»; оранжевые круги – образцы, несущие аллель «A»; черный ромб – отрицательный контроль (вода).

3.4.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaNLP3-3B* с хозяйственно-ценными признаками

1013 образцов пшеницы из коллекций предоставленных ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, АО «Щёлково Агрохим», КАСИБ, а также образцы относящиеся к популяции рекомбинантных инбредных линий пшеницы Chris Mutant x PI 518620 были оценены с использованием разработанного маркера на однонуклеотидную замену с.1824+137G>A в четвёртом интроне гена *TaNLP3-3B*. Генотипирование показало, что у коллекций озимых сортов чаще встречается аллель «A» (в среднем у 65% образцов), а у яровых аллель «G» (в среднем у 60,5% образцов). Статистические данные были получены для коллекций

озимой и яровой пшеницы из Омского АНЦ, озимой пшеницы из НЦЗ им. Лукьяненко и РИЛ пшеницы, при этом в коллекции пшеницы из Национального центра зерна не было обнаружено значимых ассоциаций.

В результате статистической обработки фенотипических данных, полученных в Москве в 2019 году, с результатами генотипирования было установлено, что аллель «А» связан с ускорением наступления колошения и цветения в среднем на 2 дня по сравнению с растениями, несущими вариант «G». Этот эффект статистически высоко достоверен и проявляется независимо от фотопериодической чувствительности. Также вариант «А» ассоциирован с небольшим, но достоверным снижением высоты растений – в среднем на 1,3 см (около 2% от средней высоты). Уменьшение высоты происходит главным образом за счёт укорочения верхних междоузлий (первого и второго), а также отмечено статистически значимое увеличение плотности колоса на 2,1% по сравнению с вариантом «G» в тех же условиях. Важно подчеркнуть, что аллель «А» в данных условиях не оказывает достоверного влияния на компоненты урожайности: массу зерна с главного колоса, массу зерна с растения, число зёрен в колосе, массу 1000 зёрен, число продуктивных побегов и индекс урожайности. Таким образом, раннеспелость достигается без видимого ущерба для продуктивности. Значения *p*-value для значимых эффектов приведены в таблице 8.

С другой стороны, на коллекции сортов озимой пшеницы из Омского АНЦ в условиях Омской области в 2023 году было установлено, что аллель *A* повышает массу 1000 зерен на 6%, число колосков в колосе на 7% и число зерен в колоске на 3%, что приводит к повышению урожайности на 30%. Хотя увеличение числа колосков и зерен в колосе было незначительным по абсолютной величине (0,844 шт. в 2023 году и 0,589 шт. в 2024 году), оно вносило вклад в общее повышение массы зерна с колоса. Совместно с положительным влиянием на массу 1000 зёрен и урожайность, это свидетельствует о потенциале аллеля для повышения продуктивности при пирамидировании с другими генами. При этом по данным за 2023 и 2024 года высота растений, несущих аллель *A*, была в среднем на 4 см выше, а колошение наступало позже на одни сутки. Для коллекции яровой пшеницы из

омского АНЦ в 2022 году в условиях Омской области также было установлено повышение урожайности на 29%.

Ppd-D1 – один из наиболее значимых генов, контролирующих фотопериодическую реакцию у пшеницы [14], который оказывает ключевое влияние на сроки наступления колошения, что, в свою очередь, влечет за собой множество эффектов, связанных с урожайностью и архитектурой растения. При совместном анализе *NLP3-3B* и *Ppd-D1* (фотопериодическая чувствительность) на коллекции сортов озимой пшеницы из Омского АНЦ в условиях Омской области в 2023 и 2024 годах обнаружен синергизм в отношении сроков: в присутствии аллеля *Ppd-D1a* (фотопериодически нейтральный) вариант «А» ускоряет цветение на 3 дня, тогда как на фоне *Ppd-D1b* (чувствительный) – только на 1 день. Хотя эффект *NLP3-3B* на скороспелость слабее, чем у *Ppd-D1a*, он носит аддитивный характер (Рисунок 8) [140].

Статистически значимое взаимодействие *NLP3-3B* × *Ppd-D1* также выявлено для длины первого (верхнего) междоузлия, числа зёрен в главном колосе и числа зёрен в колоске. В присутствии варианта «А» аллель *Ppd-D1a* увеличивает число зёрен в колосе на 7%, тогда как в присутствии варианта «G» – снижает его на 5% в 2023 году, что указывает на антагонистический характер взаимодействия по этому признаку [140].

Таблица 8 – Влияние генотипов *Ppd-D1* и *NLP3-3B* на агрономические признаки в Москве в 2019 году

Признак (ед. изм.)	Тип эффекта	Генотип	Среднее	-95% CI	+95% CI	p-value
Высота растения, см	<i>Ppd-D1</i>	aa	57,81	57,39	58,23	<0,001
		bb	59,99	59,57	60,41	
	<i>NLP3-3B</i>	GG	59,59	59,16	60,02	<0,001
		AA	58,33	57,91	58,75	
	<i>Ppd D1 + NLP3-3B</i>	aa + GG	58,25	57,65	58,85	0,189
		aa + AA	57,40	56,81	57,98	

Признак (ед. изм.)	Тип эффекта	Генотип	Среднее	-95% CI	+95% CI	p-value
Дни до колошения		bb + GG	60,85	60,26	61,44	
		bb + AA	59,20	58,61	59,79	
	<i>Ppd-D1</i>	aa	53,18	52,99	53,37	<0,001
		bb	57,67	57,52	57,82	
	<i>NLP3-3B</i>	GG	56,51	56,29	56,73	<0,001
		AA	54,65	54,47	54,84	
	<i>Ppd D1 + NLP3-3B</i>	aa + GG	54,17	53,86	54,47	0,455
		aa + AA	52,33	52,11	52,56	
		bb + GG	58,52	58,29	58,75	
		bb + AA	56,86	56,68	57,05	
Дни до цветения	<i>Ppd-D1</i>	aa	57,53	57,21	57,85	<0,001
		bb	61,21	61,01	61,40	
	<i>NLP3-3B</i>	GG	60,48	60,21	60,75	<0,001
		AA	58,46	58,19	58,74	
	<i>Ppd D1 + NLP3-3B</i>	aa + GG	58,99	58,55	59,44	<0,001
		aa + AA	56,19	55,77	56,62	
		bb + GG	61,82	61,53	62,10	
		bb + AA	60,62	60,35	60,89	
Число зёрен в главном колосе, шт.	<i>Ppd-D1</i>	aa	28,83	28,27	29,39	0,502
		bb	28,54	28,00	29,07	
	<i>NLP3-3B</i>	GG	29,31	28,75	29,87	0,003
		AA	28,09	27,56	28,63	
	<i>Ppd D1 + NLP3-3B</i>	aa + GG	28,59	27,77	29,41	<0,001
		aa + AA	29,05	28,28	29,81	
		bb + GG	29,95	29,18	30,71	

Признак (ед. изм.)	Тип эффекта	Генотип	Среднее	-95% CI	+95% CI	p-value
		bb + AA	27,16	26,42	27,91	

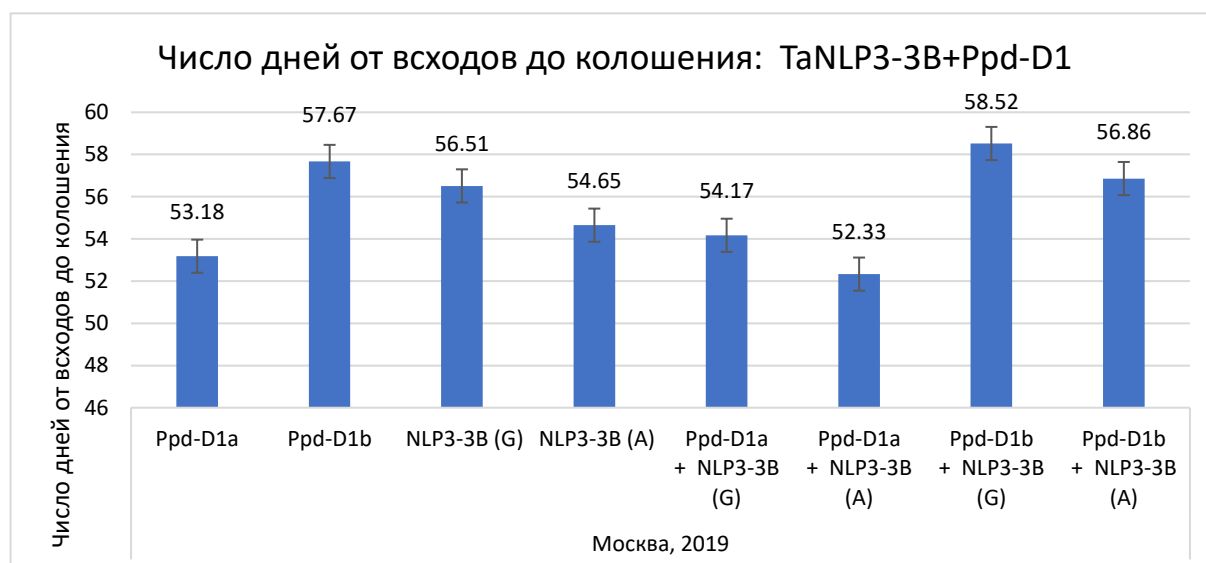


Рисунок 8 – Время между датами появления всходов и наступления колошения у растений пшеницы, имеющих различные гомозиготные генотипы по гену *Ppd-D1* и SNP-маркеру внутри гена *TaNLP3-3B*.

3.5 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF9-6A*

3.5.1 Секвенирование гена *TaGRF9-6A*

Для амплификации последовательности гена *GRF9* на хромосоме 6A у 14 сортов были подобраны 8 пар праймеров (Таблица 9). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 9. Структура гена включает 4 экзона и 3 интрона. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомеологичных генов (*TaGRF9-6B* и *TaGRF9-6D*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство

подтверждает их филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 9 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *GRF9-6A*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaGRF9-6A-F1	CCTAAGGATGCCAATCCTACGAA	60	953
	TaGRF9-6A-R1	GAAGCGTCTTTAATGGGGTTCC	60	
2	TaGRF9-6A-F2	ATCTACTCCTCCTCGCTACTACC	60	924
	TaGRF9-6A-R2	ATCCCGGATTAACAAAAGACCGA	60	
3	TaGRF9-6A-F3	TCCTTCATCATCACCGCAAATCT	60	1110
	TaGRF9-6A-R3	AGCACTGTGCATAGAGGAACAAAT	61	
4	TaGRF9-6A-F4	CAACAATGCCGCTCTCCCTA	62	1123
	TaGRF9-6A-R4	TGCTCATCGTTCCAACATGCTTA	61	
5	TaGRF9-6A-F5	CTGTTGCGATTGTTTTGCTTTCC	60	1022
	TaGRF9-6A-R5	TCTCCTCTAAATCTTTGTGGCCC	60	
6	TaGRF9-6A-F6	GCACGCATGAGAATAAGGTGGTT	62	1996
	TaGRF9-6A-R6	CCTCCCACCGGTTTTTCTCTTT	61	
7	TaGRF9-6A-F7	AAATACGTTGGGTATTGCCCCGTC	61	1042
	TaGRF9-6A-R7	GACTCTGCTCATCTGCCAAAGAT	61	
8	TaGRF9-6A-F8	TAGTTCTGTACCAACTGTGCCAA	60	1081

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
	TaGRF9-6A-R8	CCCATGATGAAGCTTTCACAACA	60	

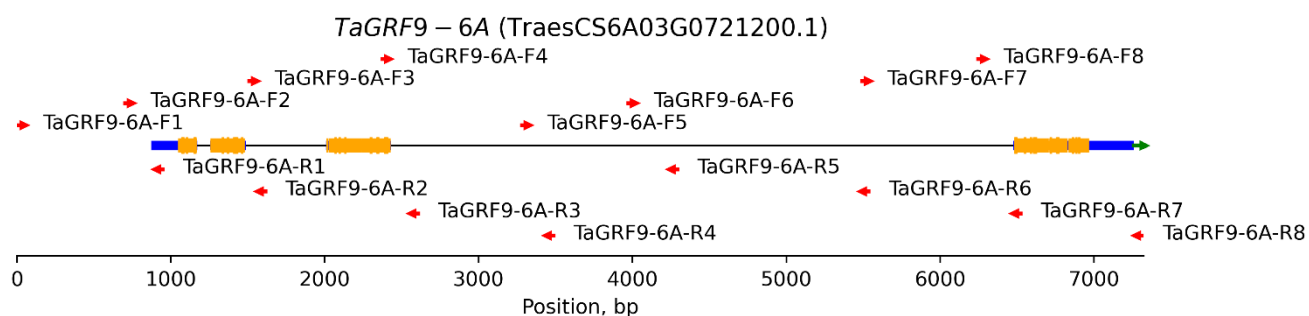


Рисунок 9 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaGRF9-6A* (TraesCS6A03G0721200.1)

3.5.2 Полиморфизмы гена *TaGRF9-6A*

У исследованных образцов пшеницы полиморфизмы в гене *TaGRF9-6A* были обнаружены исключительно в 3-ем интроне. Это были однонуклеотидные полиморфизмы: с.739+972A>Т у сорта Алтиго, с.739-863C>Т у сорта Ультра 11, с.739-799G>А у сортов Зимтра и Безостая 100, и полиморфизм с.739-605C>А, встречающийся у всех исследованных нами сортов, но не в референсном геноме сорта пшеницы Chinese Spring. Данные полиморфизмы могут повлиять на сплайсинг и привести к нонсенс-опосредованному распаду мРНК.

Среди образцов тритикале достоверные отличия в гене *TaGRF9-6A* были обнаружены только у ярового сорта Дублет. При этом отличия от последовательностей гена пшеницы были очень существенными. В районе промотора гена chr6A:g.496 017 230-496 018 065 у сорта Дублет было обнаружено 14 однонуклеотидных полиморфизмов и 12-нуклеотидная делеция (Рисунок 10 а), что может повлиять на инициацию транскрипции. В кодирующей последовательности гена *TaGRF9-6A* у сорта Дублет было обнаружено 4 однонуклеотидных полиморфизма: с.143C>G, с.562G>А, с.583G>А и с.716G>А. Все эти полиморфизмы приводят к заменам аминокислотных остатков в белке:

p.(Pro48Arg), p.(Gly188Ser), p.(Val195Ile), p.(Gly239Asp) соответственно (Рисунок 10 б).

В совокупности, изменения, наблюдаемые в гене *TaGRF9-6A* сорта яровой тритикале Дублет должны существенно повлиять на его функциональность.

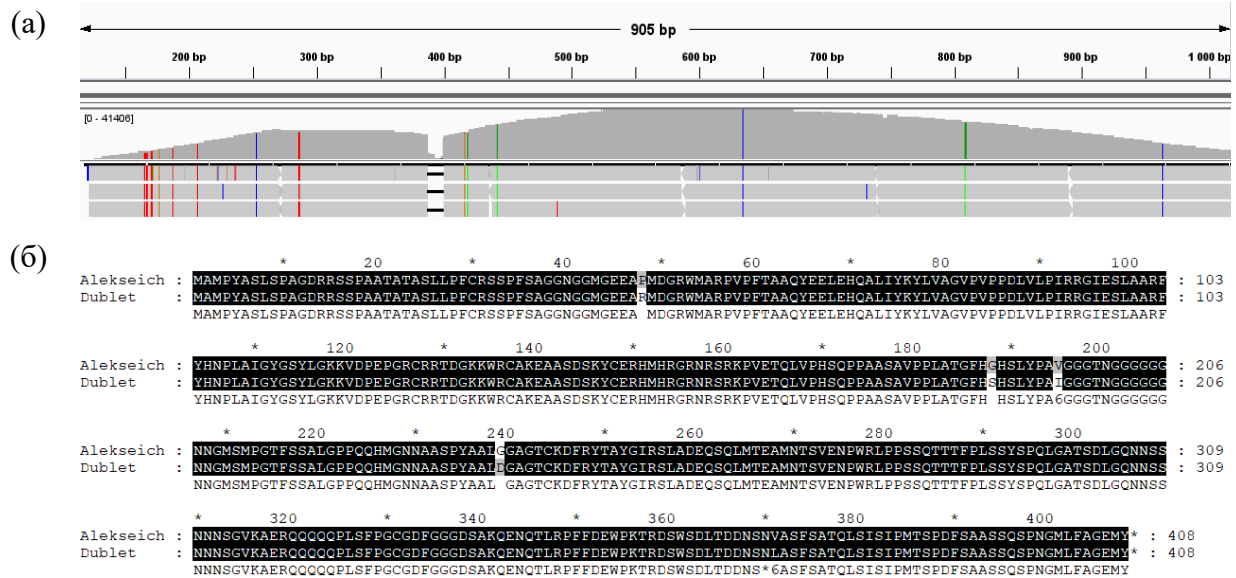


Рисунок 10 – Область промотора гена *TaGRF9-6A* у сорта яровой тритикале Дублет (а) и варианты белка, кодируемого геном *TaGRF9-6A* у пшеницы Алексеич и тритикале Дублет (б).

3.5.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaGRF9-6A*

На основе выявленного индела размером 12 пар нуклеотидов был разработан молекулярный маркер для классической ПЦР с визуализацией в агарозном геле. Были подобраны прямой и обратный праймеры фланкирующие участок промотора, содержащий 12-п.н. индел (Таблица 10). Полученный маркер однозначно детектировал аллели *GRF9-6A-12b* с наличием делеции и аллель *GRF9-6A-12a* без делеции при валидации на ДНК секвенированных сортов. С сорта Дублет амплифицировался фрагмент размером 191 п.н., что соответствует аллелю *GRF9-6A-12a*, а с остальных сортов фрагмент размером 203 п.н., что соответствует аллелю *GRF9-6A-12b* (Рисунок 11).

Таблица 10 – Последовательности праймеров маркера на полиморфизм в гене *TaGRF9-6A*

Название	Тип праймера	Последовательность праймера	Аллели	Размер, п.н.
GRF9-6A-12del-F	Прямой	CCGAGACATCGCTTTCATATTTGG	<i>GRF9-6A-12a</i>	203
GRF9-6A-12del-R	Обратный	АСТАТГТГСТТГСТТСТТГТГТС	<i>GRF9-6A-12b</i>	191

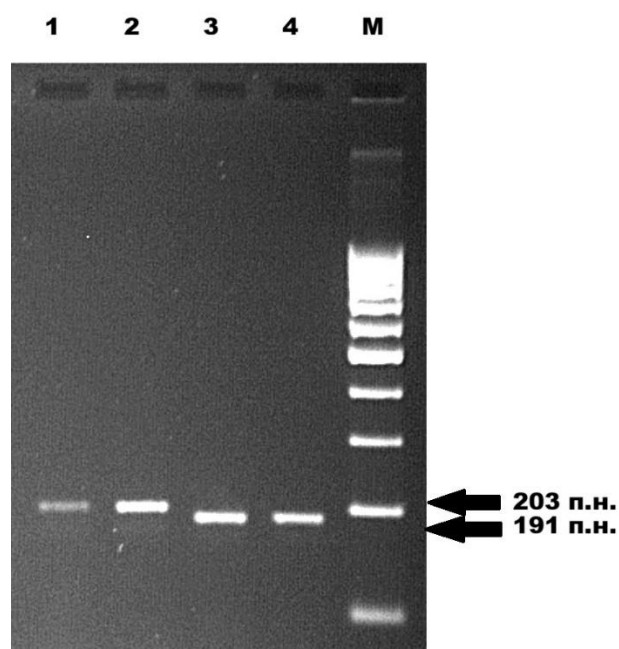


Рисунок 11 – Пример электрофореза ПЦР продукта с маркером на ген *TaGRF9-6A*. Дорожка 1 и 2 соответствуют аллелю *GRF9-6A-12a* (отсутствие делеции), дорожка 3 и 4 соответствуют аллелю *GRF9-6A-12b* (наличие делеции)

3.5.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaGRF9-6A* с хозяйственно-ценными признаками

С использованием разработанного нами маркера генотипировано 169 образцов тритикале из коллекции Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко и 132 образца пшеницы из Щелково Агрохим, а также образцы относящиеся к популяции рекомбинантных инбредных линий Хонгор х Дублет. Статистические данные были получены только для РИЛ, так как в остальных генотипированных коллекциях объём выборки оказался недостаточным для проведения статистического анализа.

Дисперсионный анализ выявил значимое влияние *GRF9-6A* на длину главного колоса. Статистически значимые эффекты наблюдались в Москве в 2019 г. и в Краснодаре в 2018 г.: гомозиготы по аллелю *GRF9-6Ab* имели колосья длиннее, чем гомозиготы *GRF9-6Aa*, на 0,3 см (3,7%) и 0,7 см (6,5%) соответственно.

Из изученных материалов известно, что *Ddw1* – это чувствительный к гиббереллину ген карликовости, который влияет на высоту растений и устойчивость к полеганию у гибридной ржи [141]. Многофакторный анализ выявил статистически значимое взаимодействие между генами по массе зерна с главного колоса. В условиях Москвы у полукарликовых растений-носителей аллеля *Ddw1* в оба года полевого эксперимента носители аллеля *GRF9-6Ab* имели более высокую массу зерна по сравнению с носителями аллеля *GRF9-6Aa*: на 0,28 г (19,2%) в 2018 г. и на 0,34 г (16,9%) в 2019 г. Этот эффект *GRF9-6Ab* у полукарликовых растений с аллелем *Ddw1* был результатом как увеличения числа зерен в колосе на 3,0 (6,8%) в 2018 г. и на 5,2 (11,6%) в 2019 г., так и повышения массы 1000 зерен на 3,7 г (11,5%) в 2018 г. и на 2,9 г (6,6%) в 2019 г. В Краснодаре положительное влияние *GRF9-6Ab* на массу зерна главного колоса у полукарликовых растений-носителей *Ddw1* наблюдалось только в 2018 г. и составило прибавку 0,35 г (19,7%), что определялось положительным влиянием *GRF9-6Ab* на число зерен в колосе (+8,5 зерен, 16,0%) [142].

Дисперсионный анализ показал значимое взаимодействие между генами по индексу урожая. В условиях Москвы отмечено увеличение индекса под влиянием аллеля *GRF9-6Ab* по сравнению с *GRF9-6Aa* у полукарликовых растений-носителей *Ddw1* на 4,0 п.п. в 2018 г. и на 2,8 п.п. в 2019 г. В Краснодаре этот эффект наблюдался только в 2018 г. и составил 2,8 п.п [142].

Дисперсионный анализ выявил значимое взаимодействие по продолжительности вегетационного периода в Москве, которое проявилось в сокращении периода до колошения под влиянием аллеля *GRF9-6Ab* у носителей *Ddw1* на 6,3 дня (10,0%) в 2018 г. и на 6,5 дня (10,2%) в 2019 г [142]. Все выявленные различия обладали высокой статистической достоверностью ($p < 0,05$).

Результаты статистических расчетов по значимым эффектами приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Совместное влияние генотипов *Ddw1* и *GRF9-6A* на массу зерна главного колоса и сроки колошения

Локация	Год	<i>Ddw1</i> генотип	<i>GRF9-6A</i> генотип	Масса зерна главного колоса, г (среднее $\pm$ SD)	Время колошения, дни (среднее $\pm$ SD)
Краснодар	2018	<i>Ddw1</i>	<i>GRF9-6Aa</i>	1,78 $\pm$ 0,61	72,6 $\pm$ 7,0
		<i>Ddw1</i>	<i>GRF9-6Ab</i>	2,13 $\pm$ 0,51	69,0 $\pm$ 3,0
		<i>ddw1</i>	<i>GRF9-6Aa</i>	2,21 $\pm$ 0,65	64,5 $\pm$ 3,4
		<i>ddw1</i>	<i>GRF9-6Ab</i>	2,43 $\pm$ 0,66	64,0 $\pm$ 2,4
	2019	<i>Ddw1</i>	<i>GRF9-6Aa</i>	1,93 $\pm$ 0,64	–
		<i>Ddw1</i>	<i>GRF9-6Ab</i>	2,03 $\pm$ 0,61	–
		<i>ddw1</i>	<i>GRF9-6Aa</i>	2,15 $\pm$ 0,65	–
		<i>ddw1</i>	<i>GRF9-6Ab</i>	1,81 $\pm$ 0,64	–

3.6 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF9-6B*

3.6.1 Секвенирование гена *TaGRF9-6B*

Для амплификации последовательности гена *GRF9* на хромосоме 6B у 14 сортов были подобраны 6 пар праймеров (Таблица 12). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Это позволило полностью секвенировать последовательность гена. Схема расположения праймеров и экзон-

интронная структура гена показаны на рисунке 12. Структура гена включает 4 экзона и 3 интрона. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомологичных генов (*TaGRF9-6A* и *TaGRF9-6D*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство подтверждает их филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 12 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *GRF9-6B*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaGRF9-6B-F1	GCACTAGATGGGCAAGAAAATCG	60	1177
	TaGRF9-6B-R1	TTAATGTGCTTTGCTTGGCTTGT	60	
2	TaGRF9-6B-F2	GAGGAGGGCGCTTGTCTATCTA	61	994
	TaGRF9-6B-R2	CATGAAGATAGCACTGGTTGGGA	60	
3	TaGRF9-6B-F3	GATATACAAGTACCTGGTGGCCG	60	1220
	TaGRF9-6B-R3	AGTTTCGGCGATAGATCATATTACA	58	
4	TaGRF9-6B-F4	CAACAATGCCTCCTCACCTAC	60	1219
	TaGRF9-6B-R4	AACGATAAATCACGACGGAGTAA	58	
5	TaGRF9-6B-F5	ATTGCCTCTCCTCTCTCACAGTA	60	1271
	TaGRF9-6B-R5	CTCGCTGCTGTTGATACAAATCC	60	
6	TaGRF9-6B-F6	CGCAGGTGACTTAAACTGAATGG	60	544
	TaGRF9-6B-R6	TGGAGCCCCTAGCATGTTAAAAG	61	

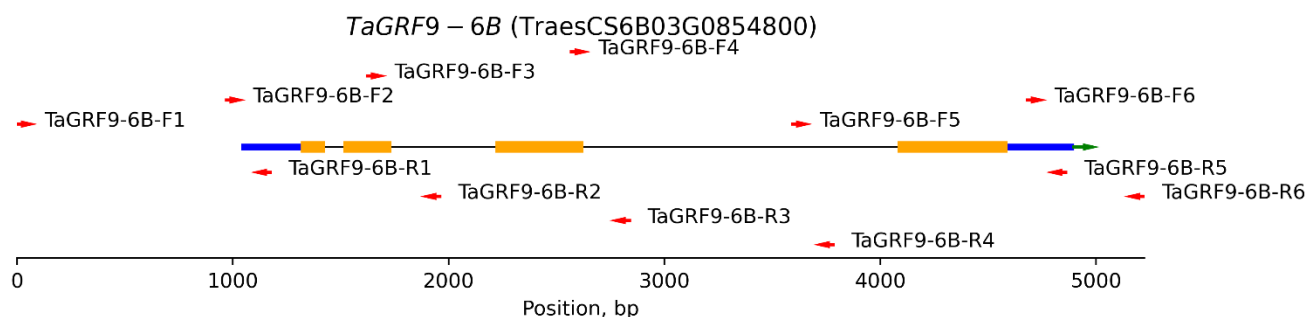


Рисунок 12 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена

TaGRF9-6B (TraesCS6B03G0854800)

3.6.2 Полиморфизмы гена *TaGRF9-6B*

У большинства образцов пшеницы последовательность гена *TaGRF9-6B* полностью соответствовала референсной последовательности генома пшеницы сорта Chinese Spring. У сортов Алтиго и Ермак в кодирующей части гена был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм с.1155C>T, не приводящий к изменению последовательности аминокислот белка. У сорта Новосибирская 67, помимо той же замены что была найдена у сортов Алтиго и Ермак, также присутствовал один полиморфизм с.905A>G, меняющий последовательность аминокислот белка р.(Asn302Ser). Данная аминокислотная замена по результатам прогноза PROVEAN не должна значимо влиять на биологическую функциональность белка.

3.6.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaGRF9-6B*

У сортов Алтиго, Ермак и Новосибирская 67 в кодирующей части гена *TaGRF9-6B* был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм с.1155C>T, который приводит к синонимичной замене кодона и не изменяет первичной структуры белка. Поскольку данный полиморфизм является почти единственным часто встречающимся полиморфизмом в гене (за исключением уникальной мутации у сорта Новосибирская 67), мы разработали на этот полиморфизм KASP-маркер (Таблица 13) Длина ампликона была 96 п.н. Праймеры GRF9-6B-1155-A и GRF9-6B-1155-B специфичны В-субгеному, общий прямой праймер амплифицируется со всех субгеномов.

Таблица 13 – Последовательности праймеров KASP-маркера на полиморфизм в гене *TaGRF9-6B*

Название	Тип праймера	Хвост праймер	Последовательность праймера	Аллель
GRF9-6B-1155-A	Прямой-FAM	GAAGGTCGGAGTCAA CGGATT	GATCTCGATACCCAT GACGTCC	T
GRF9-6B-1155-B	Прямой-HEX	GAAGGTGACCAAGTT CATGCT	GATCTCGATACCCAT GACGTCT	C
GRF9-6B-1155-C	Обратный	-	CTGCCGGCCTAGTAC ATTTTCG	-

При валидации маркера установлено, что аллель-специфичные праймеры (-А и -В) позволяют детектировать вариант однонуклеотидного полиморфизма «Т», в том числе у сортов пшеницы Алтиго, Ермак, Новосибирская 67, и вариант «С» у сортов Алексеич, Безостая 100, Гром, Паллада, Сила, Ультра 11, Васса, Зимтра и Chinese Spring (Рисунок 13).

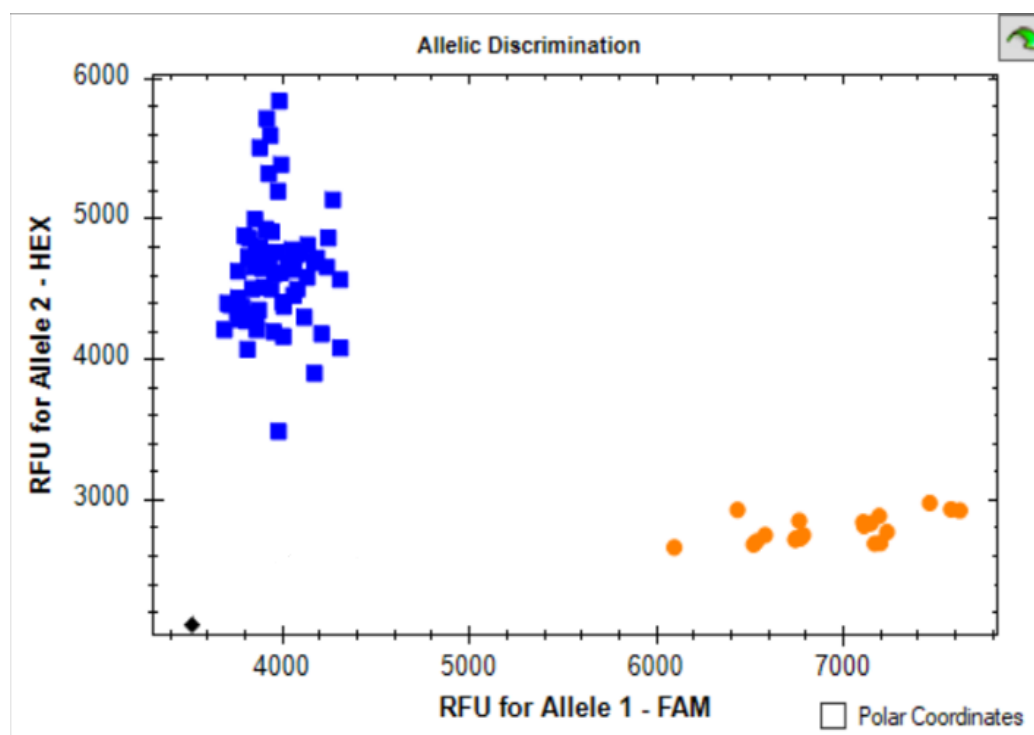


Рисунок 13 – Диаграмма результатов KASP-генотипирования по однонуклеотидному полиморфизму GRF9-6B:c.1155C>T. Синие квадраты – образцы, несущие аллель «С»; оранжевые круги – образцы, несущие аллель «Т»; черный ромб – отрицательный контроль (вода).

3.6.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaGRF9-6B* с хозяйственно-ценными признаками

С использованием разработанного нами молекулярного маркера на однонуклеотидный полиморфизм с.1155C>T были генотипировано 1013 образцов пшеницы из коллекций предоставленных ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, АО «Щёлково Агрохим», КАСИБ. Установлено, что аллель «Т» встречался среди всех коллекций на 25% чаще, чем аллель «С», что может говорить о его связи с хозяйственно-ценными признаками. Однако, по результатам статистических расчётов не было обнаружено достоверного влияния данных аллелей на изучаемые фенотипические признаки.

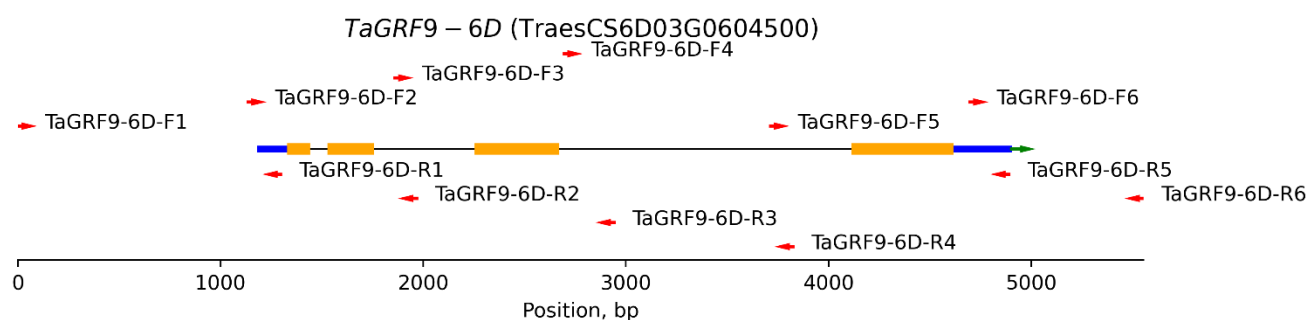
3.7 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGRF9-6D*

3.7.1 Секвенирование гена *TaGRF9-6D*

Для амплификации последовательности гена *GRF9* на хромосоме 6D у 14 сортов пшеницы и тритикале были подобраны 6 пар праймеров (Таблица 14). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 14. Структура гена включает 4 экзона и 3 интрона. Сравнительный анализ первичной структуры исследованных гомеологичных генов (*TaGRF9-6A* и *TaGRF9-6B*) выявил совпадение их экзон-интронной организации. Обнаруженное сходство подтверждает их филогенетическое родство и указывает на общее происхождение от предкового гена.

Таблица 14 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *TaGRF9-6D*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaGRF9-6D-F1	ACTGACGTTAGATACAAGTGGCA	60	1299
	TaGRF9-6D-R1	CACAACACACAAGCCAAGCTAA	60	
2	TaGRF9-6D-F2	GGAGAGAGACAAAGCCGGTAATA	60	838
	TaGRF9-6D-R2	TGGGATTACTAAAATAAGCGGAAGC	60	
3	TaGRF9-6D-F3	GTTAACCTCGCTTCGGTCTTTTGT	60	1087
	TaGRF9-6D-R3	ATCCCAGAAAGCAGATCTAAAGGC	61	
4	TaGRF9-6D-F4	ATCTCTCCATGCCATACAGTGTC	60	1134
	TaGRF9-6D-R4	CGATAAATCATCGCGACCGAGTA	60	
5	TaGRF9-6D-F5	ACTCTCTCACAGCATGTGTAAACT	60	1181
	TaGRF9-6D-R5	TGATGCGAATACGCGATTATGAA	60	
6	TaGRF9-6D-F6	GCAGGTGACTTAAACTGAATGGT	60	858
	TaGRF9-6D-R6	CAGGCTGAATCGGCAATGTAAC	60	

Рисунок 14 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaGRF9-6D* (TraesCS6D03G0604500)

3.7.2 Полиморфизмы гена *TaGRF9-6D*

Картирование коротких прочтений ампликонов на референсную последовательность показало отсутствие каких-либо различий между секвенированными образцами и референсной последовательностью сорта пшеницы Chinese Spring. Ни у одного из исследованных нами образцов пшеницы или тритикале не было выявлено полиморфизмов в гене *TaGRF9-6D*.

Для данного гена (TraesCS6D03G0604500) в геноме пшеницы RefSeq1.0 аннотировано 5 однонуклеотидных полиморфизмов, встречающихся среди образцов пшеницы с частотами от 0,1 до 3%. Низкая частота полиморфизмов говорит о том, что последовательность этого гена довольно консервативна, что может свидетельствовать о его высоком значении для растений.

3.8 Молекулярно-генетический анализ гена *TaBT2-3A*

3.8.1 Секвенирование гена *TaBT2-3A*

Для амплификации у 14 сортов пшеницы и тритикале фрагментов гена пшеницы *BT2* на хромосоме 3A нами было подобрано 6 пар праймеров (Таблица 15). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 15. Согласно данным базы данных NCBI, ген *BT2* у *A. thaliana* имеет экзон-интронную структуру, состоящую из 5 экзонов и 4 интрона [143]. Проведённый нами анализ показал, что секвенированный нами ген у пшеницы и тритикале также характеризуется сходным числом экзонов и интронов, что свидетельствует о консервативности его структурной организации в процессе эволюции. Сходная экзон-интронная структура наблюдается у, изученных нами, гомеологичных генов – *TaBT2-3D*.

Таблица 15 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *BT2-3A*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaBT2-3A-1F	AATGCACAACTAGTCAACATGG	58	1125
	TaBT2-3A-1R	TAGCATACACATGTCGTCTCCTG	60	
2	TaBT2-3A-2F	AATCTCTGCCAGTACGACATGC	61	1111
	TaBT2-3A-2R	ATCATGTGACGAGGTAGATCTGC	60	

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
3	TaBT2-3A-3F	TAATGGTTTAGCTGCCATCTCGG	61	1546
	TaBT2-3A-3R	CCATCTTTTGTGCACTTTGGC	60	
4	TaBT2-3A-4F	CAGTGAAATTCGATCATGTGGCA	60	1010
	TaBT2-3A-4R	GGTGTGAGAGTAAGCAGATCAGT	60	
5	TaBT2-3A-5F	GACGGAAACTTTATTCTGGCGTG	60	1519
	TaBT2-3A-5R	AGATGATAGAGATGAGAGAGGCA	58	
6	TaBT2-3A-6F	TTGCGATGTGTTGCTAGAAATCT	59	814
	TaBT2-3A-6R	TCTAATGCTCGCCTATGGTTGTT	60	

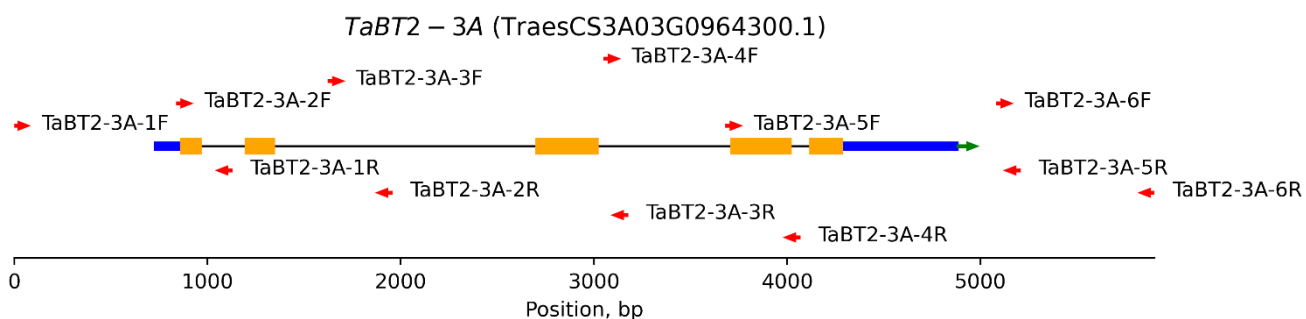


Рисунок 15 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaBT2-3A* (TraesCS3A03G0964300.1)

3.8.2 Полиморфизмы гена *TaBT2-3A*

Секвенированные нами последовательности гена у сортов Алексеич, Алтиго, Безостая 100, Ермак, Гром, Новосибирская 67, Паллада, Сила, Васса и Зимтра не отличались друг от друга. Лишь у сорта Ультра 11 была детектирована единственная однонуклеотидная замена во втором интроне с.255+65G>A, отличавшая аллель этого сорта от других, вероятно влияющая на сплайсинг мРНК.

В то же время, последовательность гена у сорта Chinese Spring, использовавшаяся в качестве референса, отличалась от всех изученных нами сортов пшеницы по 6 однонуклеотидным полиморфизмам, один из которых

находится в белок-кодирующей части гена, и одной динуклеотидной инсерцией в 3'-некодирующей области, которая может повлиять на стабильность мРНК.

При этом однонуклеотидный полиморфизм с.784T>G, составляющий одно из отличий всех секвенированных нами сортов пшеницы от сорта Chinese Spring, приводит к аминокислотной замене в белке р.(Ser262Ala) (относительно референса Chinese Spring). Обратная замена аминокислоты аланина на серин в позиции 262 белковой молекулы классифицируется с использованием алгоритма PROVEAN как значимо влияющая на функциональность белка. Таким образом, сорт Chinese Spring вероятно обладает редкой мутацией, приводящей к формированию белка BT2 с нарушенной функциональностью.

3.8.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaBT2-3A*

Следует отметить, что маркер разработан на интронную делецию 60 п. н., обнаруженную на основании выравнивания геномов базы данных мягкой пшеницы IWGSC RefSeq1.0, а не на замену с.784T>G, влияющую, по предсказанию PROVEAN, на функциональность белка: последняя мономорфна в изученной панели. Поэтому выявляемые далее ассоциации следует трактовать как ассоциации маркерного локуса; вопрос о том, обусловлены ли они самим геном *TaBT2-3A* или сцепленным с ним участком хромосомы 3A, требует отдельной проверки. Делеция 60 п.н. была выявлена в интроне у сортов Cadenza, Julius, Urartu. Однако, у Chinese Spring, и других сортов из базы данных и секвенированных сортов данная делеция отсутствовала.

На данный полиморфизм разработан ПЦР маркер с праймерами, фланкирующими искомый индел (Таблица 16). Образцы без делеции давали амплифицированный фрагмент в 333 п.н., а образцы, несущие делецию — амплифицированный фрагмент в 273 п.н. Валидация данного маркера проводилась на 6 образцах пшеницы и тритикале (PI 518620, Cltr 17241, PI 518624, Васса, Мудрец, Валентин 90) (Рисунок 16).

Таблица 16 – Последовательности праймеров маркера на полиморфизм в гене *TaBT2-3A*

Название	Тип праймера	Последовательность праймера	Аллели	Размер, п.н.
BT2-3A-F	Прямой	GGTCTGGTTGGTGGAACCTG	<i>BT2-3Aa</i> (нет делеции)	333
BT2-3A-R	Обратный	CCCATCACCAAATTAGATACTCG	<i>BT2-3Ab</i> (есть делеция)	273

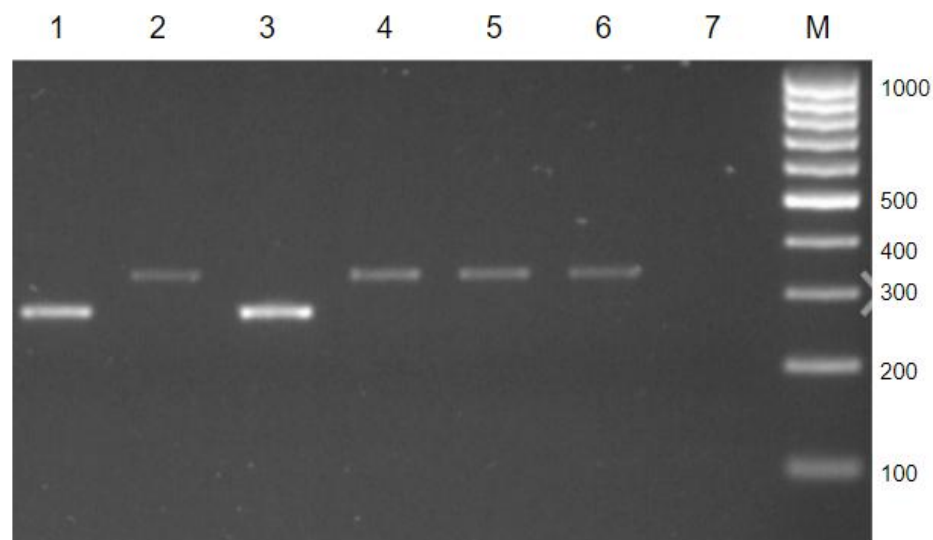


Рисунок 16 – Пример электрофореза ПЦР продукта с маркером на ген *TaBT2-3A* на образцах: 1. PI518620, 2. Cltr17241, 3. PI518624, 4. Васса, 5. Тритикале Мудрец, 6. Тритикале Валентин 90, 7. Вода (отрицательный контроль). Дорожки 3, 4, 5 и 6 соответствуют аллелю 333 (отсутствие делеции 60 п.н.), дорожка 1 и 2 соответствуют аллелю 273 (наличие делеции 60 п.н.)

3.8.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaBT2-3A* с хозяйственно-ценными признаками

С использованием разработанного маркера было генотипировано 259 образцов яровой пшеницы из ФГБНУ «Омский аграрный научный центр» и Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», а также 301 образец пшеницы из коллекции Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко и Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, а также образцы относящиеся к популяции рекомбинантных инбредных линий пшеницы Chris Mutant x PI518620. Частота встречаемости аллеля *BT2-3Aa* среди образцов

пшеницы значительно превышает аллель *BT2-3Ab*, что может косвенно указывать на негативный эффект аллеля *b* на хозяйственно-ценные признаки. Статистические данные были получены только для РИЛ пшеницы, так как для остальных коллекций объём выборки оказался недостаточным для проведения статистического анализа.

По данным, полученным на РИЛ пшеницы в условиях Москвы в 2019 году, обнаружены наиболее значимые эффекты. Индивидуальный эффект *BT2-3Aa* ассоциирован с увеличением массы зерна с главного колоса на +30% относительно *BT2-3Ab*. Сочетание аллеля *BT2-3Ab* с фотопериодически чувствительным *Ppd-D1b* задерживало переход к колошению примерно на четыре дня относительно альтернативного аллеля, тогда как на фоне *Ppd-D1a* различий не наблюдалось. При этом главный эффект *BT2-3A* зависит от аллеля *Ppd-D1*. При *Ppd-D1a* разница между аллелями *BT2* не значима, а при *Ppd-D1b* она составляет 4 дня, что сходно с индивидуальным эффектом *Ppd* [144]. Взаимодействие также проявлялось в том, что эффект *Ppd-D1* был вдвое сильнее при *BT2-3Ab* (+9,2), чем при *BT2-3Aa* (+4,3), а эффект *BT2-3A* менял направление в зависимости от *Ppd-D1* (–1,0 при *Ppd-D1a*, +3,9 при *Ppd-D1b*). Комбинация *BT2-3Ab* × *Ppd-D1b* давала в среднем на 4,9 дня больше, чем ожидалось при аддитивной модели, что указывает на синергическое взаимодействие генов. На практике это означает, что применять разработанный маркер на *BT2-3A* необходимо совместно с контролем генетического фона. Значения *p*-value для значимых эффектов приведены в таблице 17.

Таблица – 17 Влияние гена *BT2-3A* и его взаимодействий с *Ppd-D1* на массу главного колоса и сроки колошения

Аллель	Признак	Среднее	p-value
<i>BT2-3Aa</i> × <i>Ppd-D1a</i>	Дней до колошения	52,3	<0,001
<i>BT2-3Ab</i> × <i>Ppd-D1a</i>		51,3	
<i>BT2-3Aa</i> × <i>Ppd-D1b</i>		56,6	

Аллель	Признак	Среднее	p-value
<i>BT2-3Ab x Ppd-D1b</i>		60,5	<0,01
<i>BT2-3Aa</i>		54,4	
<i>BT2-3Ab</i>		55,7	
<i>BT2-3Aa x Ppd-D1a</i>	Масса зерна с главного колоса, г	1,27	0,658
<i>BT2-3Ab x Ppd-D1a</i>		1,09	
<i>BT2-3Aa x Ppd-D1b</i>		1,35	
<i>BT2-3Ab x Ppd-D1b</i>		0,94	
<i>BT2-3Aa</i>		1,31	<0,05
<i>BT2-3Ab</i>		1,01	

3.9 Молекулярно-генетический анализ гена *TaBT2-3D*

3.9.1 Секвенирование гена *TaBT2-3D*

Для амплификации последовательности гена *BT2* на хромосоме пшеницы 3D, нами были подобраны 6 пар праймеров (Таблица 18). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 17.

Согласно данным базы данных NCBI, ген *BT2* у *A. thaliana* имеет экзон-интронную структуру, состоящую из 5 экзонов и 4 интрона [143]. Проведённый нами анализ показал, что секвенированный нами ген у пшеницы и тритикале также характеризуется сходным числом экзонов и интронов, что свидетельствует о

консервативности его структурной организации в процессе эволюции. Сходная экзон-инотропная структура наблюдается у, изученных нами, гомеологичных генов – *TaBT2-3A*. Секвенирование ПЦР-продуктов по коротким фрагментам, показало, что у большинства изученных нами сортов не наблюдается отличий по данному гену друг от друга и от последовательности сорта пшеницы Chinese Spring, за исключением сорта Ультра 11.

Таблица 18 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *BT2-3D*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaBT2-3D-1F	AGAAATACCCATCCGAATCTCCG	60	1404
	TaBT2-3D-1R	TAAACCATGTGAGAGCTGGAAGG	60	
2	TaBT2-3D-2F	AGTACTAGTATTAACACGCGAGG	58	530
	TaBT2-3D-2R	GAAGGGTCGATCGTAATCAAGGA	60	
3	TaBT2-3D-3F	ACCAAACCAACAACGAAAACCAT	60	1574
	TaBT2-3D-3R	CATCATGACGGGACCTCAGC	61	
4	TaBT2-3D-4F	CCAAAGCGCTGCGAAAGATC	61	508
	TaBT2-3D-4R	GCATAGAGTGTTTGGGTCAGTTC	60	
5	TaBT2-3D-5F	CTTTGGGTTCCGGACGTGAT	60	1062
	TaBT2-3D-5R	GCTGATTCTCGTTGTGATTGCA	60	
6	TaBT2-3D-6F	TTCACTTACCCCAACACGCAG	61	1122
	TaBT2-3D-6R	GGTTGTGATTTGGGCTACGATTT	60	

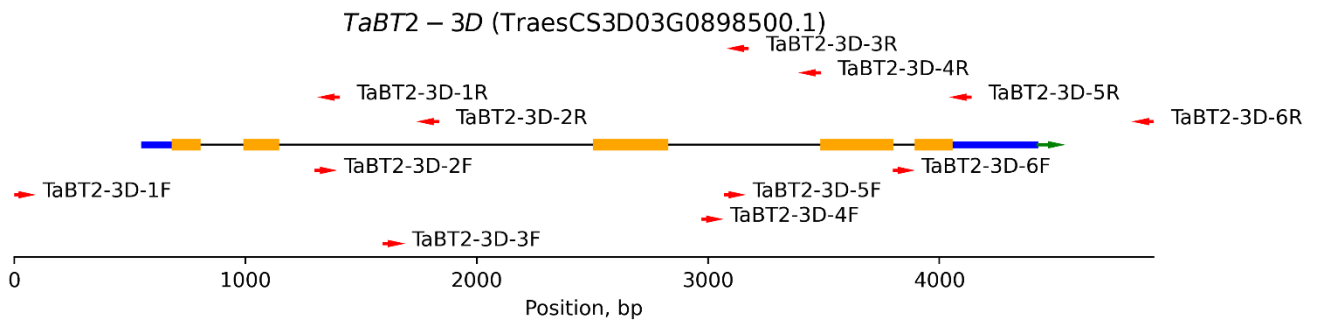


Рисунок 17 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaBT2-3D* (TraesCS3D03G0898500.1)

3.9.2 Полиморфизмы гена *TaBT2-3D*

У сорта Ультра 11 в 4-м экзоне наблюдается резкое снижение глубины секвенирования. Это может свидетельствовать о наличии крупного изменения в данном регионе гена типа инсерции/делеции. Наблюдаемые полиморфизмы на участке с низкой глубиной покрытия свидетельствуют о фактическом секвенировании фрагментов неспецифического ПЦР-продукта. Действительно, отличающийся фрагмент 4-го экзона на самом деле полностью соответствует последовательности соседнего гена *TraesCS3D03G0898400*, который, по-видимому, является паралогом гена *TraesCS3D03G0898500.1*, образовавшимся в результате локальной инверсии.

Таким образом, у сорта Ультра 11 есть вероятность наличия полиморфизма в 4-ом экзоне гена *BT2-3D*.

3.10 Молекулярно-генетический анализ гена *TaGS2-2A*

3.10.1 Секвенирование гена *TaGS2-2A*

Для амплификации последовательности гена *GS2* на хромосоме 2A у 14 сортов нами были подобраны 6 пар праймеров (Таблица 19). Праймеры

подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 18. Структура гена включает 11 экзонов и 12 интронов.

Таблица 19 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *GS2-2A*

№	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaGS2-2A-F1	CTGACAAAGGGGTCCATCCATC	61	1598
	TaGS2-2A-R1	GAGAAAATGATGGCTGCTCATCC	60	
2	TaGS2-2A-F2	AATCAAGGGTACGCGTTCGATAG	61	501
	TaGS2-2A-R2	GCATAAAGCACGTCCAGATGAAA	60	
3	TaGS2-2A-F3	GATGAGCAGCCATCATTTTCTCC	60	1358
	TaGS2-2A-R3	ATGCACCTACCGAGTCTACGATA	60	
4	TaGS2-2A-F4	TTGTTCCGTGATGGCCTGAT	60	521
	TaGS2-2A-R4	ACACACGGCAAGATATAATTGTAGA	58	
5	TaGS2-2A-F5	CCAAGTGATCATCCTTTTGCTGT	59	618
	TaGS2-2A-R5	AGATTGTTGTTTCTCACTCGCAA	59	
6	TaGS2-2A-F6	AAGGTATTTCAAACAGGGCCTGA	60	1562
	TaGS2-2A-R6	TCGTTTCTTCAGAGCTGAGAGAC	60	

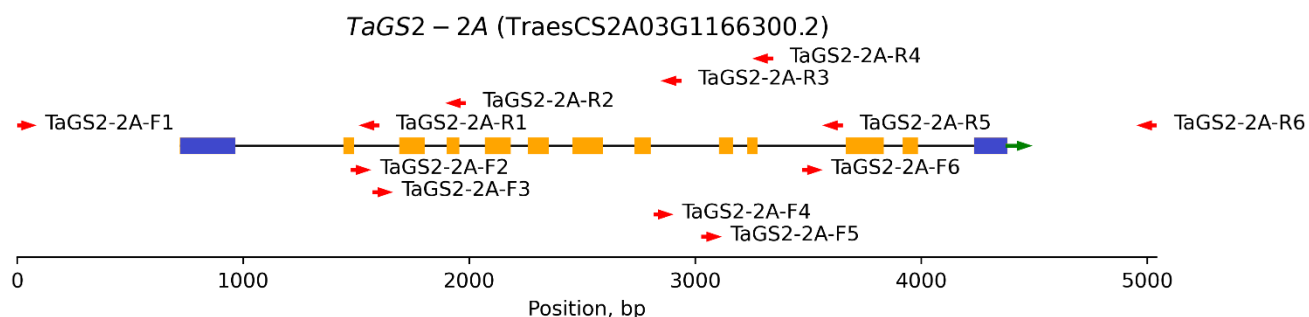


Рисунок 18 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaGS2-2A* (TraesCS2A03G1166300.2)

3.10.2 Полиморфизмы гена *TaGS2-2A*

Секвенирование ПЦР-продуктов с применением методов нового поколения позволило выявить делецию в 10 п.н., по которым различаются два аллеля этого гена – *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab*.

Помимо аллелей *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab* в результате картирования прочтений нами были зафиксированы еще 3 «рекомбинантных» варианта последовательности гена. У сорта пшеницы Ультра 11 был обнаружен аллель, близкий к *TaGS2-2Aa* (*TaGS2-2Aa.1*), а у сорта пшеницы Алтиго – аллель, близкий к *TaGS2-2Ab* (*TaGS2-2Ab.1*). При этом оба «новых» аллеля отличались от близких им известных по 1 SNP и длине короткого tandemного повтора (T)_n в интроне гена, которые могут приводить к нарушению сплайсинга. У сорта Васса обнаружен «рекомбинантный» аллель, примерно половина которого соответствует аллелю *TaGS2-2Ab*, а остальная часть – аллелю *TaGS2-2Aa*. Однако, данный результат, скорее всего, является результатом ошибки опыта, связанной с фрагментной амплификацией генов для секвенирования.

3.10.3 Разработка молекулярных маркеров на аллельные варианты гена *TaGS2-2A*

Для идентификации аллельных вариантов гена *TaGS2-2A* разработали ПЦР-маркер (STS), основанный на детекции индела в промоторной области гена. В ходе предварительного анализа нуклеотидных последовательностей *TaGS2-2A* было обнаружено, что два основных гаплотипа, обозначенных как *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab*, различаются наличием делеции длиной 10 пар оснований в промоторе. Эта делеция расположена примерно в 570–573 нуклеотидах выше сайта начала транскрипции и служит диагностическим признаком для различения аллелей. Для амплификации фланкирующего эту делецию участка были сконструированы праймеры pGS2-2A-F и pGS2-2A-R, последовательности которых подбирались таким образом, чтобы они были комплементарны консервативным регионам, окружающим индел (Таблица 20). Полимеразная цепная реакция с использованием этих праймеров приводит к образованию ампликонов разной длины в зависимости от аллеля: у образцов, несущих аллель *TaGS2-2Ab*, продукт имеет длину 182 п.н., тогда как у носителей *TaGS2-2Aa* из-за наличия делеции (потери 10 п.н.) образуется более короткий фрагмент – 172 п.н. (Рисунок 19). Такое различие легко детектируется с помощью обычного электрофореза в агарозном геле, что делает маркер удобным для массового генотипирования. В результате валидации данного маркера было подтверждено наличие аллеля *TaGS2-2Aa* у образцов пшеницы мягкой Алексеич, Безостая 100, Ермак, Сила, Зимтра, Валентин 90, а также у сортов тритикале Дублет и Мудрец. Аллель *TaGS2-2Ab* был обнаружен у образцов пшеницы мягкой Гром, Паллада, и Новосибирская 67.

Таблица 20 – Последовательности праймеров маркера на полиморфизм в гене *TaGS2-2A*

Название	Тип праймера	Последовательность праймера	Аллели	Размер, п.н.
pGS2-2A-F	Прямой	GGCCTCCGCTCCCATAAATATAA	TaGS2-2Aa	172

Название	Тип праймера	Последовательность праймера	Аллели	Размер, п.н.
pGS2-2A-R	Обратный	AACGCAACAGAGATTGAAGAAGC	TaGS2-2Ab	182

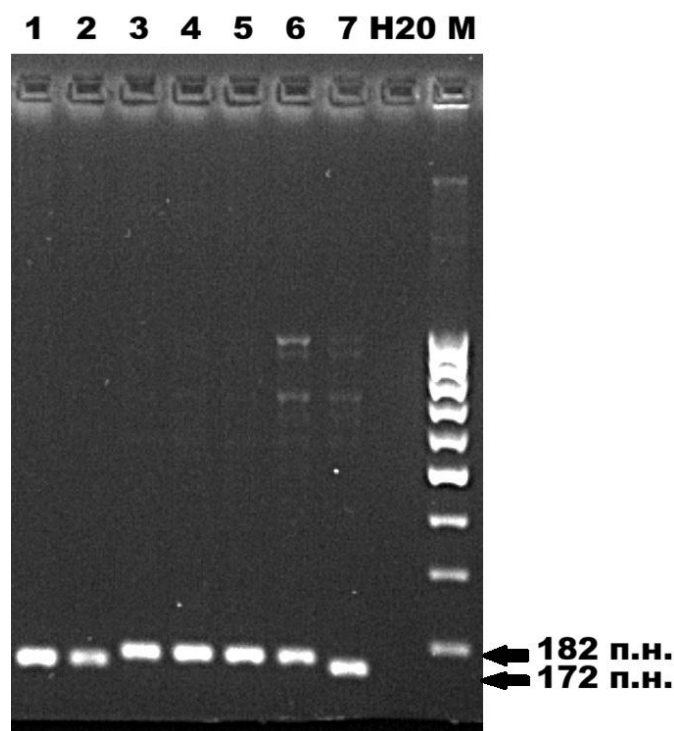


Рисунок 19 – Пример электрофореза ПЦР продукта с маркером на ген *TaGS2-2A*. Дорожки 1,2,7 соответствуют аллелю *TaGS2-2Aa* (наличие делеции), дорожка 3,4,5,6 соответствуют аллелю *TaGS2-2Ab* (отсутствие делеции)

3.10.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaGS2-2A* с хозяйственно-ценными признаками

С использованием разработанного маркера было генотипировано 917 образцов пшеницы, относящиеся к коллекциям из ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, АО «Щёлково Агрохим». Генотипирование показало, что аллель *TaGS2-2Ab* встречается в 60% образцов

среди всех коллекций, аллель *TaGS2-2Aa* – в 33%, 7% образцов – гетерозиготы. Статистические данные получены для большинства генотипированных коллекций: озимой и яровой пшеницы из Омского АНЦ, РИЛ пшеницы, пшеницы из НЦЗ им. Лукьяненко.

В условиях Омской области в 2022 году на коллекции яровой пшеницы однофакторный дисперсионный анализ выявил, что растения с аллелем *TaGS2-2Aa* имели достоверно более высокую массу 1000 зёрен (+ 9%), более длинный колос (+17%), большее число зёрен в колосе (+ 19%) и, как следствие, более высокую массу зерна с колоса (+ 30%) по сравнению с растениями, несущими аллель *TaGS2-2Ab*. В 2023 году значимые различия сохранились только по длине колоса: +0,8 см (+11%); по другим признакам различия были статистически незначимыми.

В условиях Омской области в 2023 году на коллекции озимой пшеницы установлено, что аллель *TaGS2-2Aa* ассоциирован с более высокой массой зерна с колоса (+ 11%), и как следствие более высокой массой 1000 зерен (+ 4%) и урожайностью (+ 27%). В тех же условиях в 2024 году *TaGS2-2Aa* выявил ассоциацию с увеличением урожайности (+ 14,5%), однако при этом у растений с этим аллелем наблюдалось снижение числа зерен в колоске на 4,5%. Кроме того, у РИЛ пшеницы в условиях Москвы в 2019 году аллель *TaGS2-2Aa* ассоциирован с ускорением наступления колошения в среднем на сутки. Полученные результаты в совокупности свидетельствуют о положительном вкладе аллеля *TaGS2-2Aa* в продуктивность, несмотря на разнонаправленные эффекты по отдельным признакам.

При анализе *TaGS2-2A* совместно с транслокацией 1RS.1BL выяснилось, что положительный эффект аллеля *TaGS2-2Aa* значительно сильнее проявляется на фоне отсутствия транслокации 1RS.1BL. Например, у растений без транслокации (генотип 1BS.1BL) разница в массе зерна с колоса между *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab* достигала 56%, тогда как у растений с транслокацией эта разница составляла всего 18%. Аналогичная картина наблюдалась для массы 1000 зёрен и длины колоса. Это может быть связано с тем, что транслокация 1RS.1BL оказывает настолько сильное положительное влияние на признаки, что она маскирует дополнительный вклад

аллеля *TaGS2-2Aa*. При этом самая высокая продуктивность зафиксирована у растений, сочетающих одновременно транслокацию 1RS.1BL и аллель *TaGS2-2Aa*, но разница между генотипами с разными аллелями *TaGS2-2A* в присутствии транслокации была небольшой и статистически незначимой [16]. Все значимые различия обладали высокой статистической достоверностью ($p < 0,001$). Результаты статистических расчетов по значимым эффектами приведены в таблице 21.

Таблица 21 – Эффекты аллелей *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab* на агрономические признаки

Признак	<i>TaGS2-A1a</i> + 1RS.1BL	<i>TaGS2-A1b</i> + 1RS.1BL	<i>TaGS2-A1a</i> + 1BS.1BL	<i>TaGS2-A1b</i> + 1BS.1BL
2022 год				
Масса зерна с главного колоса (г)	1,3	1,1	1,4	0,9
Масса 1000 зёрен (г)	38,0	35,9	38,6	33,4
Длина главного колоса (см)	9,7	8,5	9,9	7,8
Число колосков в главном колосе (шт.)	15,6	15,2	14,1	13,3
Число зёрен в главном колосе (шт.)	34,4	30,7	35,0	26,2
Высота растения (см)	95,1	98,2	99,3	86,0
Период «всходы – колошение» (дней)	44,5	42,8	40,8	40,7
Период «всходы – восковая спелость» (дней)	83,2	83,5	81,8	81,7
2023 год				

Признак	<i>TaGS2-A1a</i> + 1RS.1BL	<i>TaGS2-A1b</i> + 1RS.1BL	<i>TaGS2-A1a</i> + 1BS.1BL	<i>TaGS2-A1b</i> + 1BS.1BL
Масса зерна с главного колоса (г)	1,0	1,0	1,0	0,9
Масса 1000 зёрен (г)	38,1	36,6	37,1	36,4
Длина главного колоса (см)	8,5	7,9	8,2	7,1
Число колосков в главном колосе (шт.)	13,6	13,6	12,6	11,9
Число зёрен в главном колосе (шт.)	27,1	27,3	27,5	27,5
Высота растения (см)	80,0	81,1	74,2	78,1
Период «всходы – колошение» (дней)	44,4	44,1	43,0	42,0
Период «всходы – восковая спелость» (дней)	83,0	82,7	81,8	80,1

3.11 Молекулярно-генетический анализ гена *TaNGR5-1D*

3.11.1 Секвенирование гена *TaNGR5-1D*

Для амплификации последовательности гена *NGR5* на хромосоме 1D у 14 сортов были подобраны 8 пар праймеров (Таблица 22). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 20. Структура гена включает 9 экзонов и 9 интронов.

Таблица 22 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *NGR5-1D*

№	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaNGR5-1D-1F	ACGGGGATACACACATAGTACA	58	1535
	TaNGR5-1D-1R	GAGGGAGTATAAGGTGGCCAAAA	60	
2	TaNGR5-1D-2F	TAGCCTGGGAGATGAGATCTGAT	60	1568
	TaNGR5-1D-2R	AACAAGAGCTGAATGGCGTTAG	59	
3	TaNGR5-1D-3F	CACGGCACAACAATCTTGCA	60	638
	TaNGR5-1D-3R	CAGACTAATTAGCTCAGTTTCACCA	59	
4	TaNGR5-1D-4F	GCTAACGCCATTCAGCTCTT	59	1708
	TaNGR5-1D-4R	AGGTACTTGTATTACTACGAAGGC	58	
5	TaNGR5-1D-5F	CCCATGGTGAAACTGAGCTAATTA	59	1658
	TaNGR5-1D-5R	TGACGGTTTATGTCGCGAAA	58	
6	TaNGR5-1D-6F	TGGGCCTTCGTAGTAATACAAGT	59	1201
	TaNGR5-1D-6R	TCAGCATTTTCAGATTCAGCAGAA	59	
7	TaNGR5-1D-7F	TTTCGCGACATAAACCGTCA	58	2445
	TaNGR5-1D-7R	ACACTCGCTCCTTGCTTTTCTAA	60	
8	TaNGR5-1D-8F	CGGGAACAAGGCAATTCATCTTT	60	629
	TaNGR5-1D-8R	TGTCATAGTGAATATGGGGGCTG	60	

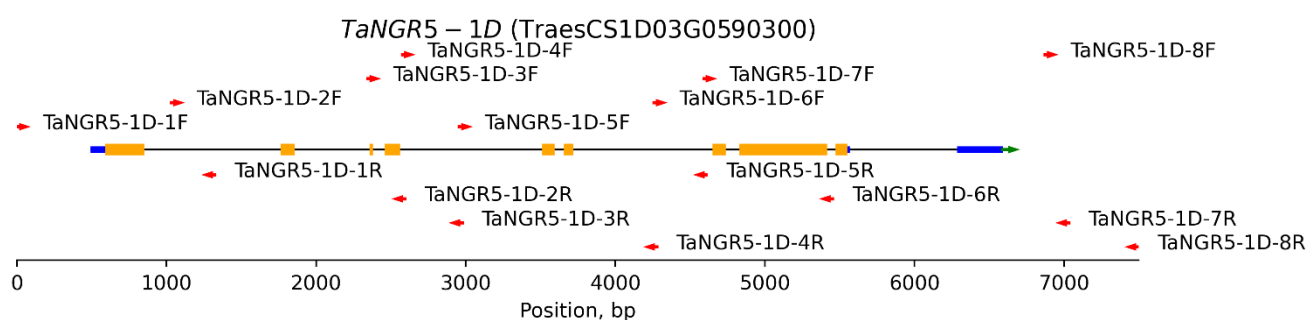


Рисунок 20 – Расположение подобранных праймеров экзон-интронная структура гена *TaNGR5-1D* (TraesCS1D03G0590300)

3.11.2 Полиморфизмы гена *TaNGR5-1D*

В результате картирования коротких прочтений на референсную последовательность было обнаружено всего лишь 2 SNP приходящихся на некодирующие области гена. Это замена с.556+109C>T в 6-м интроне у сорта пшеницы Безостая 100 и замена с.*190T>C в последнем, 10-м экзоне, полностью расположенном в 3'-нетранслируемой области гена у сорта пшеницы Новосибирская 67. Таким образом, у большинства изученных сортов пшеницы последовательность гена *NGR5-1D* не отличается от референсной, а обнаруженные у 2 сортов мутации, скорее всего, незначительно влияют на функционирование гена.

3.11.3 Разработанные маркеры *TaNGR5-1B*

Так как у большинства изученных сортов пшеницы последовательность гена *NGR5-1D* не отличалась от референсной были оценены последовательности гомеологов этого гена на основании последовательностей из баз данных. Был обнаружен индел длиной 4 нуклеотида на расстоянии 570-573 п.н. от сайта начала транскрипции в гомеологичном гене *NGR5-1B*. На данный полиморфизм был разработан KASP-маркер (Таблица 23). Данный маркер различает два гаплотипа. Гаплотип с наличием делеции был назван *pNGR5-1Ba*, и найден в 5 образцах

мягкой пшеницы (более редкий вариант). Гаплотип с отсутствием делеции был назван *pNGR5-1Bb* и был обнаружен у 9 образцов мягкой пшеницы, а также в последовательностях из баз данных спельты, твердой пшеницы (Kronos) и дикой полбы (Zawitan).

Таблица 23 – Последовательности праймеров KASP-маркера на полиморфизм в гене *TaNGR5-1D*

Название	Тип праймера	Хвост праймера	Последовательность праймера	Аллели
pNGR5-1B	Прямой-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT	GCAACATTAACACGGATGTAGCC	<i>pNGR5-1Ba</i>
	Прямой-HEX	GAAGGTCGGAGTCAACGGATT	GCAACATTAACACGGATGTAGCA	<i>pNGR5-1Bb</i>
	Обратный	-	AGGTGTA CTGCGCTGCATAT	-

3.11.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaNGR5-1B* с хозяйственно-ценными признаками

Разработанный маркер использован для генотипирования 892 образцов пшеницы из коллекций ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, АО «Щёлково Агрохим», КАСИБ. Статистические данные получены для коллекций яровой и озимой пшеницы из Омского АНЦ, а также для коллекции КАСИБ.

Статистически достоверные ассоциации были обнаружены в коллекции сортов яровой пшеницы из Омского АНЦ в условиях Омской области в 2022 году. Установлено, что аллель *pNGR5-1Ba* вызывает задержку наступления колошения на 4 дня и наступление восковой спелости на 2 дня, а в 2023 году задержку наступления колошения и восковой спелости на 2 дня. При этом в 2023 году урожайность была на 14% выше.

На коллекции озимой пшеницы из Омского АНЦ в 2024 году также установлена задержка наступления колошения на 2 дня у образцов, несущих аллель *pNGR5-1Ba*, при этом эти же образцы имели достоверно более длинный колос (+9%).

Результаты статистических расчетов на коллекции КАСИБ показали, что аллель *pNGR5-1Ba* оказывает ярко выраженный положительный эффект на продуктивность. Урожайность растений с этим аллелем в среднем на 15,7% выше в условиях Курганской области, на 31,2% выше в условиях Омской области и на 38,7% выше в условиях Челябинской области, чем у носителей аллеля *pNGR5-1Bb*, что согласуется с результатами, полученными нами в Омской области в 2023 году на яровой пшенице. Помимо урожайности, аллель *pNGR5-1Ba* статистически значимо ассоциирован с повышением массы 10 колосьев до обмолота, в среднем на 17% в условиях Омской области и на 21,4% в условиях Челябинской области. Масса зерна с 10 колосьев также была выше у носителей *pNGR5-1Ba*: на 18% в условиях Омской области и на 23,9% в условиях Челябинской области. Кроме того, отмечено увеличение массы 1000 зёрен на 12,8% у образцов, несущих аллель *pNGR5-1Ba* в условиях Челябинской области. Однако наряду с положительными эффектами на продуктивность, наличие аллеля *pNGR5-1Ba* замедляло развитие растений в среднем на 1,6% в Омской области и на 2,4% в Челябинской области. Значения p-value для значимых эффектов приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Эффекты аллелей *pNGR5-1Ba* и *pNGR5-1Bb* на агрономические признаки

Локация	Признак	Аллель гена	Средние значения признака	Разница между аллелями	Разница между аллелями, %	p-value
Курган	Урожайность, г/м ²	<i>pNGR5-1Ba</i>	368,2	50	15,7	0,001
		<i>pNGR5-1Bb</i>	318,2			
Омск	Число дней всходы-колошение	<i>pNGR5-1Ba</i>	38,5	1,5	4	0,003
		<i>pNGR5-1Bb</i>	37,0			
	Число дней всходы-созревание	<i>pNGR5-1Ba</i>	101,5	1,6	1,6	0,005
		<i>pNGR5-1Bb</i>	99,9			
	Урожайность, г/м ²	<i>pNGR5-1Ba</i>	330,8	78,8	31,2	2 * 10 ⁻⁸
		<i>pNGR5-1Bb</i>	252,1			
	Масса 10 колосьев до обмолота, г	<i>pNGR5-1Ba</i>	15,1	2,3	17	1 * 10 ⁻⁶
		<i>pNGR5-1Bb</i>	12,9			
		<i>pNGR5-1Ba</i>	11,2	1,8	18	1,7 * 10 ⁻⁵

Локация	Признак	Аллель гена	Средние значения признака	Разница между аллелями	Разница между аллелями, %	p-value
	Масса зерна с 10 колосьев, г	<i>pNGR5-1Bb</i>	9,5			
Челябинск	Число дней всходы-созревание	<i>pNGR5-1Ba</i>	90,2	2,1	2,4	$5,9 * 10^{-4}$
		<i>pNGR5-1Bb</i>	88,1			
	Урожайность, г/м ²	<i>pNGR5-1Ba</i>	417,3	116,5	38,7	$8,9 * 10^{-11}$
		<i>pNGR5-1Bb</i>	300,8			
	Масса 10 колосьев до обмолота, г	<i>pNGR5-1Ba</i>	11,9	2,2	21,4	$1 * 10^{-6}$
		<i>pNGR5-1Bb</i>	9,8			
	Масса зерна с 10 колосьев, г	<i>pNGR5-1Ba</i>	8,8	1,7	23,9	$4 * 10^{-7}$
		<i>pNGR5-1Bb</i>	7,1			
	Масса 1000 зерен, г	<i>pNGR5-1Ba</i>	33,9	3,9	12,8	$8 * 10^{-6}$
		<i>pNGR5-1Bb</i>	30,04			

3.12 Молекулярно-генетический анализ гена *TaAMT-2B*

3.12.1 Секвенирование гена *TaAMT-2B*

Для амплификации последовательности гена *AMT* на хромосоме 2В у 14 сортов были подобраны 4 пары праймеров (Таблица 25). Праймеры подбирались с перекрытием и покрывали целиком последовательность гена с промотором и терминатором, а также его фланкирующие регионы. Схема расположения праймеров и экзон-интронная структура гена показаны на рисунке 21. Структура гена включает 1 экзон. Размер ампликона, полученного с парой праймеров №1 у сорта Алексеич отличался от ожидаемого и составлял примерно 429 пар оснований, что свидетельствует о наличии крупной делеции.

Таблица 25 – Праймеры, подобранные на последовательность гена *AMT-2B*

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
1	TaAMT-2B-1F	GATGTGTTTCAGCCTTTTCGTTCA	60	609
	TaAMT-2B-1R	CTAGTTTCTCGCACTCTTCTGGT	60	

№ пары праймеров	Обозначение	Последовательность, 5'-3'	Tm, °C	Длина ампликона, п.н.
2	TaAMT-2B-2F	GATCTCGCACGTGAATCTCAAAG	60	1795
	TaAMT-2B-2R	CCGAGACGAAACCGCAGATG	61	
3	TaAMT-2B-3F	TCCAACGGGTTTATCGGGAAG	60	1769
	TaAMT-2B-3R	GTAGCCGTCAGTTGTGTGTAAAC	60	
4	TaAMT-2B-4F	CGTTCTATCGAGCATCACTTTCG	60	569
	TaAMT-2B-4R	GACATTGTTTAGGAGACGTCTGC	60	

TaAMT-2B (TraesCS2B03G0984000.1)

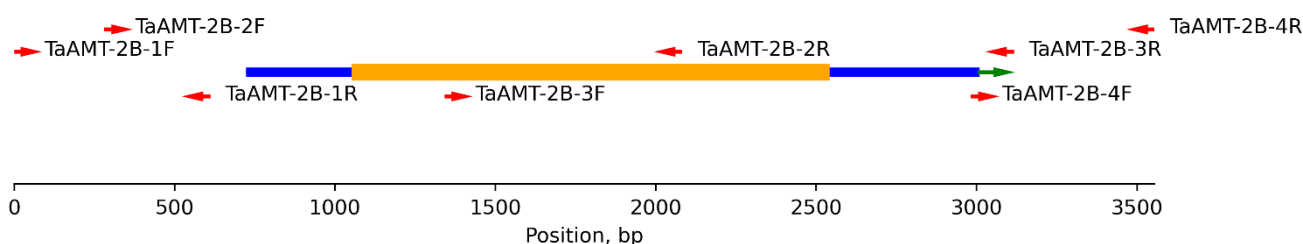


Рисунок 21 – Расположение подобранных праймеров и экзон-интронная структура гена *TaAMT-2B* (TraesCS2B03G0984000.1)

3.12.2 Полиморфизмы гена *TaAMT-2B*

Многочисленные отличия в гене транспортера аммония *AMT-2B* (TraesCS2B03G0984000.1) от референсного генома были обнаружены у сорта пшеницы Алексеич. У всех остальных сортов в гене *TaAMT-2B* не было найдено отличий от референсного генома Chinese Spring.

По результатам картирования коротких прочтений на референс, ген *TaAMT-2B* у сорта пшеницы Алексеич отличался по 4 однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) и одной 5-нуклеотидной инсерции в промоторе, двум синонимичным SNP в белок-кодирующей части гена, SNP и 3-нуклеотидной делеции в 3'-некодирующей

области гена и 4 SNP и 3-нуклеотидной делеции в терминаторе. При электрофорезе ПЦР-продуктов гена *TaAMT-2B* у сорта Алексеич был обнаружен фрагмент изменённого размера, что позволило предположить наличие крупной делеции. Секвенирование этого участка подтвердило делецию размером 160 п.н. Вероятно, данный редкий полиморфизм унаследован от линии Лютесценс 2935к51, которая присутствует в родословной сорта Алексеич. Эти полиморфизмы могут вызывать нарушение транскрипции, в том числе приводить к нокауту гена.

3.12.3 Разработанные маркеры *TaAMT-2B*

На выявленную крупную делецию у сорта Алексеич был разработан молекулярный ПЦР маркер, позволяющий детектировать данный индел с помощью электрофореза в агарозном геле. Были подобраны праймеры (Таблица 26). У образцов, не несущих делеции амплифицировался фрагмент 500 п.н., у сорта Алексеич, несущего делецию, амплифицировался фрагмент 340 п.н. (Рисунок 22).

Таблица 26 – Последовательности праймеров маркера на полиморфизм в гене *TaAMT-2B*

Название	Тип праймера	Последовательность праймера	Аллели	Размер, п.н.
pAMT-2B-F	Прямой	CATCACCATCTCTAGAGGCAACA	<i>pAMT-2Ba</i>	500 (нет делеции)
pAMT-2B-R	Обратный	TATCGTGTGGTGACGATGGTTTT	<i>pAMT-2Bc</i>	340 (есть делеция)

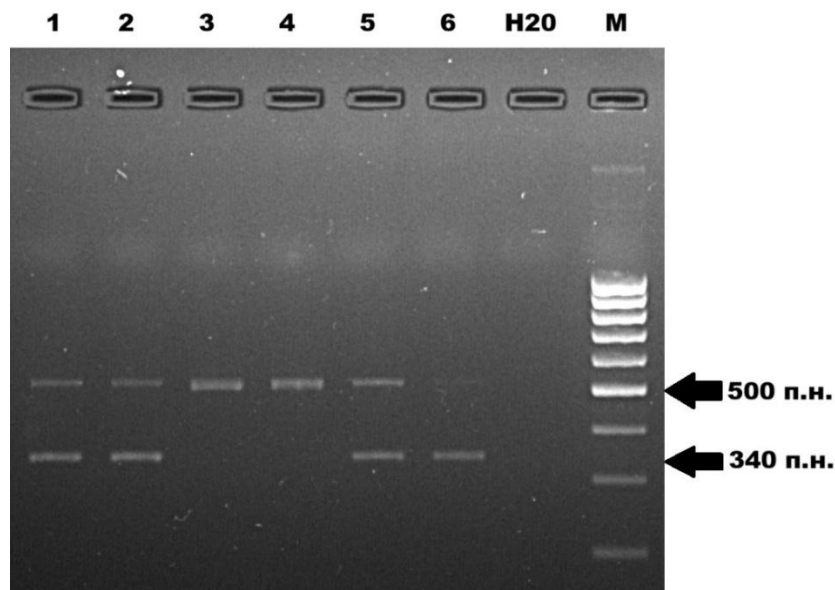


Рисунок 22 – Пример электрофореза ПЦР продукта маркера *TaAMT-2B* на сортах: 1. Сила, 2. Зимтра, 3. Васса, 4. Алтиго, 5. Гром, 6. Алексеич. Дорожки 3, 4 соответствуют аллелю 500 (отсутствие делеции 160 п.н.), дорожка 6 соответствует аллелю 340 (наличие делеции 160 п.н.), остальные дорожки относятся к гетерозиготам.

3.12.4 Ассоциация аллельных вариантов гена *TaAMT-2B* с хозяйственно-ценными признаками

Разработанный на крупную делецию *TaAMT-2B* маркер был использован для генотипирования 762 образцов пшеницы из коллекций ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко, Федерального Исследовательского центра «Немчиновка», Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, АО «Щёлково Агрохим», КАСИБ, а также образцы относящиеся к популяции рекомбинантных инбредных линий пшеницы Chris Mutant x PI518620.

При оценке ассоциаций между генотипами и фенотипами был выявлен эффект гена *TaAMT-2B* на содержание белка в зерне: наличие аллеля *rAMT-2Ba* увеличивает его содержание в зерне на 0,52 процентного пункта, что составляет 3,9% относительно носителей *rAMT-2Bb* в условиях Москвы в 2020 году.

Обнаружены положительные эффекты аллеля *pAMT-2Bb* на коллекции яровой пшеницы из Омского АНЦ, которую оценивали в 2022 и 2023 годах. Присутствует слабовыраженный эффект на массу 1000 зерен, у образцов с аллелем *pAMT-2Bb* среднее значение данного признака на 6,8% выше в 2022 году и на 9,7% в 2023 году, чем у образцов с альтернативным аллелем (Рисунок 23). Кроме того, значимый эффект наблюдался на признак массы зерна с колоса, аллель *pAMT-2Bb* приводил к увеличению массы на 11% в 2023 году. Ген *TaAMT-2B* также ассоциирован с урожайностью, у сортов, содержащих аллель *pAMT-2Bb*, она была выше на 13% в 2022 году. Значения p-value для значимых эффектов приведены в таблице 27.

Таблица 27 – Влияния аллелей *pAMT-2Ba* и *pAMT-2Bb* на продуктивные признаки и качество зерна

Год, локация	Признак	Аллель	Среднее	95% CI	p-value
Омск, 2022	Масса 1000 зёрен, г	<i>pAMT-2Ba</i>	34,90	33,78 – 36,02	0,0188
		<i>pAMT-2Bb</i>	37,28	35,67 – 38,60	
	Масса зерна с колоса, г	<i>pAMT-2Ba</i>	1,095	1,008 – 1,178	0,949
		<i>pAMT-2Bb</i>	1,090	0,961 – 1,175	
	Урожайность, т/га	<i>pAMT-2Ba</i>	2,624	2,430-2,809	0,0393
		<i>pAMT-2Bb</i>	2,968	2,762-3,184	
Омск, 2023	Масса 1000 зёрен, г	<i>pAMT-2Ba</i>	35,31	33,86 – 36,40	0,0019

Год, локация	Признак	Аллель	Среднее	95% CI	p-value
	Масса зерна с колоса, г	<i>pAMT-2Bb</i>	38,73	37,66 – 39,98	0,0269
		<i>pAMT-2Ba</i>	0,969	0,917 – 1,020	
		<i>pAMT-2Bb</i>	1,075	1,014 – 1,172	
Москва, 2020	Содержание белка в зерне, %	<i>pAMT-2Ba</i>	13,70	13,52 – 13,92	0,024
		<i>pAMT-2Bb</i>	13,18	12,94 – 13,50	

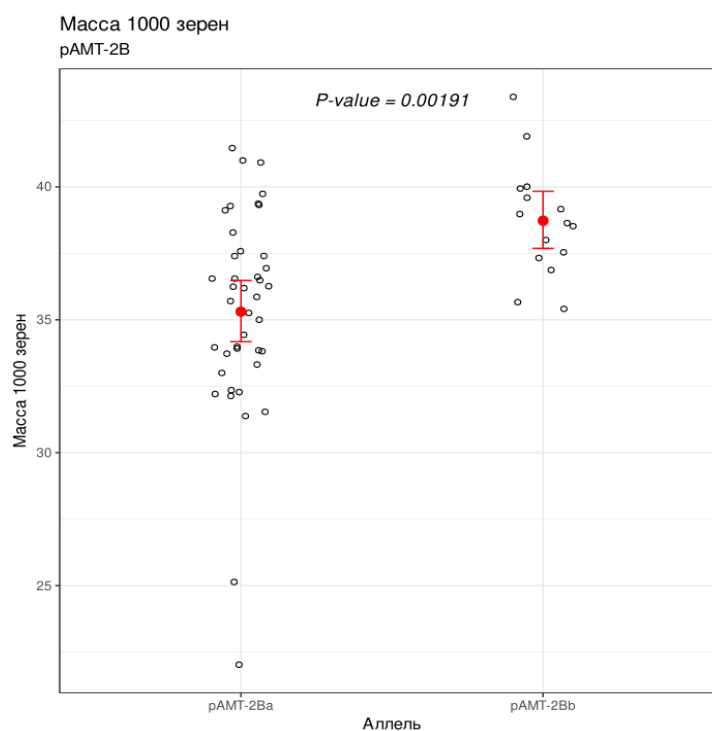


Рисунок 23 – Эффект аллелей гена *TaAMT-2B* на массу 1000 зерен в коллекции яровой пшеницы из Омского АНЦ (183 образца) в 2023 году.

4. Обсуждение

4.1 Зависимость эффектов аллелей генов азотного обмена от генетического фона

Работа устроена как проверка одного класса гипотез: сохранилось ли у мягкой пшеницы и тритикале аллельное разнообразие в генах, вовлечённых в транспорт, ассимиляцию и сигналинг азота, и связано ли оно с хозяйственно-ценными признаками. Результат главы 3 отвечает на этот вопрос двояко. Разнообразие сохранилось, но его вклад в признаки в большинстве случаев не самостоятелен: величина, а иногда и знак эффекта определяются аллельным состоянием другого гена – гена короткостебельности, гена фотопериодической чувствительности *Ppd-D1* или наличием пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL.

Такая условность не является методической неудачей – она предсказуема из того, как устроена регуляция азотного обмена у злаков. Два ключевых регулятора, показанные для риса, работают через один и тот же узел – белки DELLA, то есть через ту же точку, в которой действуют мутации короткостебельности. Транскрипционный фактор *GRF4* является антагонистом DELLA в координации роста и метаболизма азота и углерода: повышение соотношения *GRF4*/DELLA одновременно увеличивает поглощение и ассимиляцию азота и сохраняет высокую урожайность у полумкарликовых сортов [12]; тот же *GRF4* действует через фактор *MYB61*, усиливающий использование азота и накопление биомассы [120]. Второй регулятор, *NGR5*, стабилизируется белками DELLA и деградирует при гиббереллиновом сигналинге; именно поэтому у полумкарликовых сортов «зелёной революции» *NGR5* накапливается сильнее и азот-зависимое кущение у них выше [24]. Иными словами, для двух независимых регуляторов азотного обмена в литературе прямо показано, что их количество и активность зависят от статуса DELLA.

Отсюда следует проверяемое предсказание: у растений, различающихся по аллелям генов короткостебельности – а *Rht-B1b*, *Rht-B1p* (*Rht17*) и большинство гиббереллин-нечувствительных мутаций представляют собой преждевременный стоп-кодон в области, кодирующей домен DELLA [136], – эффекты аллельных вариантов генов азотного обмена должны различаться. В нашей работе это предсказание подтверждает взаимодействие *Ddw1* × *TaGRF9-6A* у тритикале (Таблица 11). Ген *Ddw1* не затрагивает сам белок DELLA, но как гиббереллин-чувствительный ген короткостебельности снижает содержание активных гиббереллинов [145], что ведёт к накоплению DELLA и, следовательно, сдвигает тот же регуляторный узел. Совпадение предсказания, выведенного из молекулярных данных по рису, с результатом, полученным на тритикале, составляет один из основных результатов работы.

Второй фон, на котором эффекты оказались условными, – сроки развития. Взаимодействия *Ppd-D1* × *TaNLP3-3B* по дате цветения и *Ppd-D1* × *TaBT2-3A* по дате колошения (таблицы 8, 17) означают, что вклад аллеля в продуктивность частично опосредован тем, в какое календарное окно попадают критические фазы. Это согласуется с общей картиной для азотного обмена, где поглощение и ремобилизация азота жёстко привязаны к фазе развития [3], а активность пластидной GS2 и реассимиляция азота смещаются после цветения к ремобилизации из вегетативных органов [3,94]. Сдвиг фенологии на два-шесть дней меняет соотношение фаз со средой, и потому меняет реализацию любого аллеля, работающего в азотном обмене.

Третий фон – транслокация 1RS.1BL, маскирующая эффект *TaGS2-2A*. Здесь механизм проще и не связан с DELLA: 1RS.1BL несёт крупный блок генов, положительно влияющих на элементы продуктивности, устойчивость к патогенам и засухе и на скорость старения листа [17], и её собственный эффект превосходит эффект отдельного локуса азотного обмена. Явление маскирования слабого эффекта сильным – общее для взаимодействий такого рода, и оно уже описано для генов короткостебельности, вернализации и фотопериодизма.

В соответствии с этим, маркер-ориентированный отбор по локусам азотного обмена следует вести с одновременным контролем аллельного состояния перечисленных генов, а величины эффектов, полученные на одном фоне, нельзя переносить на другой. Ниже это показано на каждом гене в отдельности.

4.2 *TaPARG-2A*: противоречие между прогнозом функциональности и распространённостью аллеля

Ген *PARG-2A* кодируют транскрипционные факторы семейства AP2/EREBP. Для двух генов *TaPARG* пшеницы показаны плеiotропные эффекты на архитектуру растения и признаки продуктивности, причём сверхэкспрессия у риса снижала высоту растения, завязываемость семян и массу 1000 зёрен и усиливала кущение [7]. Найденная в настоящей работе несинонимичная замена с.793C>T, приводящая к р.(His265Tyr), ранее описана как ключевая для гаплотипов Нар-2A-2 и Нар-2A-3, которые широко распространены среди китайских сортов и связаны с меньшей высотой растения, меньшей кустистостью и большей массой 1000 зёрен [7]. Разработанный KASP-маркер [8,139] позволил впервые оценить распространённость этой замены в отечественном материале: аллель «С», совпадающий с референсным геномом Chinese Spring, обнаружен лишь у 4 из 805 генотипированных образцов (0,5 %) – у сортов пшеницы Ермак, Jerry, Akord и селекционного образца тритикале 0-113t12.

Здесь необходимо прямо назвать противоречие, которое иначе останется незамеченным. Данные по рису говорят, что снижение функциональности *PARG* благоприятно: сверхэкспрессия ухудшала признаки, однако для пшеницы именно аллель «Т», сохраняющий функциональность, считается благоприятным [7]. Авторы признают, что сверхэкспрессия пшеничного гена в рисе – это гетерологичная система. Эффекты могут быть усилены или искажены из-за различий в генетическом фоне двух видов. Поэтому окончательные выводы о функции *TaPARG* в пшенице должны быть подтверждены экспериментами в самой пшенице. Данные по гаплотипам пшеницы говорят обратное: благоприятны

гаплотипы, несущие замену с.793C>T, то есть аллель «Т», который в изученных коллекциях как раз и преобладает [7]. При этом у сорта Chinese Spring, у которого маркер детектирует аллель «С», прогноз PROVEAN (score = -4,749) указывает на нарушение функциональности белка.

Можно сделать вывод, что направления действия полиморфизмов в гене *PARG-2A* у пшеницы требует дальнейших уточнений, но крайне малое содержание нефункционального аллеля «С» в структуре коллекций может свидетельствовать о давлении негативного отбора на него. Практическое значение полученного результата заключается в том, что маркер даёт возможность целенаправленно искать носителей редкого аллеля, а не находить их случайно для дальнейшего изучения влияния полиморфизма на модельных популяциях.

4.3 *TaNLP3-3B*: ассоциация с фенологией и проблема локализации эффекта

Белки NLP (NIN-like proteins) – центральное звено первичного нитратного ответа: NLP7 удерживается в ядре при появлении нитрата [22] и работает как собственно сенсор нитрата [21], а семейство NLP в целом занимает ключевое положение в нитратном сигналинге [146]. Взаимодействие NLP с факторами TSP определяет системный ответ на доступность нитрата [84], а у риса показан путь OsNRT1.1B–OsCNGC14/16–Ca²⁺–OsNLP3, поддерживающий азотный гомеостаз через фосфорилирование [108]. Для *OsNLP3* показано положительное влияние на длину метёлки, число ветвей и число зёрен при достаточном азотном питании [23]; белки NLP несут консервативные домены RWP-RK и PB1, отвечающие за связывание ДНК и белок-белковые взаимодействия [147]. На этом фоне выявленный в работе полиморфизм с.1824+137G>A в четвёртом интроне гена *TaNLP3-3B* и разработанный на него KASP-маркер дают инструмент для проверки функции ортолога у пшеницы на большом материале.

Главный результат – устойчивая ассоциация варианта «А» с более ранним колошением и цветением (в среднем на 1,9 и 2,0 дня, Таблица 8) при отсутствии

значимого влияния на компоненты продуктивности. Следовательно, это редкое и практически ценное сочетание, поскольку скороспелость в северных регионах позволяет уходить от предуборочного прорастания и заморозков, а в южных – от терминальной засухи.

Результат по пшенице находится в частичном противоречии с данными по рису, где вариация генов *NLP* была сильно связана с урожайностью, архитектурой метёлки и кущением [23]: в данных условиях подобных изменений у пшеницы мы не наблюдали, а наблюдали эффект на сроки развития, о котором для риса и ячменя прямо не сообщалось. Возможное объяснение – различие в чувствительности к нитрату, способное менять темп развития [148]; альтернативное – что эффект принадлежит не самому *TaNLP3-3B*. Второе объяснение нельзя отбросить: все три выявленных полиморфизма гена либо синонимичны, либо расположены в некодирующих областях, а хромосома 3В давно описана как несущая гены скороспелости [149], взаимодействующие с генами фотопериодической реакции; для неё же в полногеномном ассоциативном анализе найдены связи со скороспелостью [150].

Взаимодействие с *Ppd-D1* уточняет картину. Эффект варианта «А» на дату колошения аддитивен эффекту *Ppd-D1* и проявляется на обоих фонах, тогда как для даты цветения выявлено взаимодействие: на фоне фотопериодически нейтрального *Ppd-D1a* ускорение составляет 2,8 дня, на чувствительном фоне *Ppd-D1b* – 1,2 дня (Таблица 8). Кроме того, *Ppd-D1a* снижает высоту преимущественно за счёт нижних междоузлий и уменьшает число колосков в колосе [140], тогда как вариант «А» *TaNLP3-3B* снижает высоту за счёт верхних междоузлий и увеличивает плотность колоса. Отсюда следует, что *TaNLP3-3B* либо действует на более поздних этапах развития, чем *Ppd-D1*, либо имеет механизм, отличный от фотопериодической чувствительности. Для окончательного ответа необходим анализ экспрессии *TaNLP3-3B* у родительских линий и рекомбинантных потомств.

Однако результаты, полученные на коллекции сортов озимой пшеницы в условиях Омской области, согласуются с данными, полученными у риса, аллель «А» имел большую урожайность в сравнении с альтернативным аллелем. При этом

эффект *OsNLP3* был сильно связан с обеспеченностью азотным питанием [23], это может объяснить сильную зависимость проявления эффекта этого гена от условий полевого опыта в нашей работе. Дальнейшее изучение его влияния на хозяйственно-ценные признаки требует проведения дополнительных опытов в строго контролируемых условиях азотного питания.

4.4 *TaGRF9-6A*: компенсаторный эффект в фоне *Ddw1* и асимметрия аллельного разнообразия гомеологов

Транскрипционные факторы *GRF* занимают в координации роста и азотного обмена особое положение: соотношение *GRF4/DELLA* определяет баланс между накоплением биомассы и использованием азота, и его сдвиг позволяет сочетать полукарликовость с высокой эффективностью использования азота [12,120]. Именно поэтому ген *GRF9* был выбран как кандидат на роль компенсатора негативных плеiotропных эффектов генов короткостебельности.

Секвенирование показало резкое различие между пшеницей и тритикале. У изученных сортов пшеницы полиморфизмы гена *TaGRF9-6A* обнаружены только в третьем интроне, тогда как у ярового сорта тритикале Дублет – 14 однонуклеотидных замен и 12-нуклеотидная делеция в области промотора и четыре несинонимичные замены в кодирующей последовательности, приводящие к заменам p.(Pro48Arg), p.(Gly188Ser), p.(Val195Ile), p.(Gly239Asp). Такая концентрация различий у одного генотипа объясняется происхождением аллеля: у гексаплоидного тритикале субгеном А происходит от твёрдой пшеницы, и аллель *GRF9-6Ab* представляет собой вариант, отличный от вариантов мягкой пшеницы. Совокупность промоторных и аминокислотных замен делает изменение функциональности этого аллеля весьма вероятным, однако прямых данных об экспрессии или активности белка работа не содержит, и это следует считать гипотезой, а не установленным фактом.

Ассоциативный анализ подтвердил компенсаторную роль аллеля *GRF9-6Ab*: в фоне гена *Ddw1* он увеличивал массу зерна с главного колоса, причём прирост

достигался и за счёт числа зёрен, и за счёт массы 1000 зёрен, а колошение наступало существенно раньше – то есть аллель одновременно снимал два основных плейотропных дефекта гена короткостебельности (Таблица 11). Практическая ценность второго эффекта выше, чем кажется: *Ddw1* задерживает колошение и тем расширяет окно уязвимости к фузариозу колоса [15], поэтому ускорение развития в *Ddw1*-фоне работает не только на продуктивность, но и на уход от болезни.

Компенсация оказалась обусловленной средой, эффект был устойчив и выражен в условиях Москвы (Центральный Нечерноземный регион), но не воспроизвёлся в Краснодаре в 2019 году (Таблица 11), где сочетание повышенных температур в критические фазы и вероятного дефицита влаги ограничивало фотосинтетическую способность и распределение ассимилятов в зерно. Кроме того, локации различались длиной дня в период колошения (Москва ~17–18 ч против Краснодара ~15–16 ч), что могло взаимодействовать с температурой и дополнительно менять реализацию компенсаторного механизма. Вывод для селекции: механизм компенсации не универсален, и отбор по паре *Ddw1* + *GRF9-6Ab* оправдан прежде всего для зон с благоприятным водообеспечением.

Полученные данные вписываются в картину функциональной специализации внутри семейства GRF у тритикале: если *TaGRF3-2A* выступает как регулятор размера зерна [151], а ржаной *ScGRF3-2R* дополнительно снижает высоту [152], то *GRF9-6A* проявляет себя как регулятор скороспелости и морфогенеза колоса. Физиологический механизм может быть связан с известной ролью факторов *GRF* в регуляции активности меристем и переходов между фазами развития, в том числе через взаимодействие с генами KNOX и гиббереллиновым сигналингом [153]. Такая специализация открывает возможность целенаправленного пирамидирования: *Ddw1* для устойчивости к полеганию, *GRF9-6Ab* для снятия его плейотропных дефектов, *TaGRF3-2A* для дополнительного увеличения массы зерна.

Отдельного объяснения требует отсутствие результата по гомеологам. Ген *TaGRF9-6B* оказался почти инвариантным: у большинства сортов последовательность совпадала с референсной, у Алтиго и Ермака найдена

синонимичная замена с.1155C>T, у Новосибирской 67 дополнительно с.905A>G с заменой р.(Asn302Ser), которая по прогнозу PROVEAN на функциональность не влияет. Разработанный на синонимичную замену KASP-маркер при генотипировании 1013 образцов ассоциаций с признаками не выявил – результат, ожидаемый для синонимичного варианта, не затрагивающего ни белок, ни, судя по расположению, регуляторные элементы. Ген *TaGRF9-6D* оказался полностью мономорфным во всей изученной панели, что согласуется с аннотированными для него в IWGSC RefSeq1.0 редкими полиморфизмами (частоты 0,1–3 %) и указывает на высокую функциональную значимость этого гомеолога; ассоциативный анализ по нему не проводился, поскольку типировать было нечего.

4.5 *TaBT2-3A*: зависимость эффекта от аллельного состояния *Ppd-D1*

Гены ВТ кодируют скаффолдные белки с доменами ВТВ и TAZ и описаны как отрицательные регуляторы поглощения нитрата и эффективности использования азота у арабидопсиса и риса [25]. В настоящей работе секвенирование *TaBT2-3A* и *TaBT2-3D* показало высокую консервативность обоих гомеологов у изученных сортов: последовательности сортов между собой практически не различались, а единственная замена с предсказанным функциональным значением – с.784T>G, приводящая к р.(Ser262Ala) и оцениваемая PROVEAN как значимо влияющая на функциональность белка, – отличала от изученных сортов только референсный геном Chinese Spring. Высокая консервативность гена в изученной панели может отражать как функциональное ограничение изменчивости, так и узость генетической основы отечественного материала, различить эти объяснения позволит сопоставление с панелями мирового разнообразия.

Поскольку значимая замена в панели не варьировала, маркер был разработан на другой полиморфизм – делецию 60 п. н. в интроне, выявленную при сравнении с последовательностями сортов Cadenza и Julius и дикого диплоидного вида *T. urartu*. Все дальнейшие ассоциации относятся, строго говоря, к маркерному локусу;

вопрос о том, обусловлены ли они самим геном *TaBT2-3A* или сцепленным с ним участком хромосомы 3A, требует секвенирования гена у контрастных по маркеру образцов коллекции.

Главные эффекты аллельного состояния *BT2-3A* значимы по обоим ключевым признакам: массе зерна главного колоса ($p < 0,05$) и числу дней до колошения ($p < 0,01$). Значимым также оказалось взаимодействие *BT2-3A* $\times$ *Ppd-D1* по срокам колошения ($p < 0,001$) (Таблица 17).

Сочетание аллеля *BT2-3Ab* с фотопериодически чувствительным *Ppd-D1b* задерживало переход к колошению в среднем на четыре дня, тогда как на фоне *Ppd-D1a* различий не наблюдалось. Иными словами, главный эффект *BT2-3A* зависит от аллельного состояния *Ppd-D1*: при *Ppd-D1a* разница между аллелями *BT2* незначима, а при *Ppd-D1b* она составляет 4 дня, что сопоставимо с индивидуальным эффектом *Ppd-D1*.

Взаимодействие также проявлялось в асимметрии эффектов. Эффект *Ppd-D1* был вдвое сильнее при *BT2-3Ab* (+9,2 дня), чем при *BT2-3Aa* (+4,3 дня), а эффект *BT2-3A* менял направление в зависимости от *Ppd-D1*: $-1,0$ дня при *Ppd-D1a* и $+3,9$ дня при *Ppd-D1b*. Комбинация *BT2-3Ab* $\times$ *Ppd-D1b* давала эффект на 4,9 дня больше, чем ожидалось при аддитивной модели, что указывает на синергическое взаимодействие генов.

Таким образом, в одной и той же паре генов наблюдаются одновременно два феномена. На фоне фотопериодически нейтрального аллеля *Ppd-D1a* эффект *BT2-3Ab* на сроки колошения статистически незначим, что указывает на маскировку: состояние *Ppd-D1* «перекрывает» вклад *BT2-3A*. Напротив, на фоне чувствительного аллеля *Ppd-D1b* эффект *BT2-3Ab* не только проявляется, но и усиливается – это синергизм. Маскировка и синергизм не противоречат друг другу, а отражают разные состояния одной регуляторной сети.

Сходная картина получена для пары *Ddw1* $\times$ *TaGRF9-6A* у тритикале: эффект аллеля на массу зерна проявляется только на определённом фоне гена короткостебельности. Это позволяет говорить об общей закономерности: эффект

аллеля количественного признака определяется генетическим контекстом, а не является его внутренним свойством.

На практике это означает, что применять разработанный маркер на *TaBT2-3A* необходимо совместно с контролем генетического фона – в первую очередь по гену *Ppd-D1*. Без учёта состояния *Ppd-D1* эффект *BT2-3A* может быть не выявлен.

4.6 *TaGS2-2A*: связь промоторной делеции с наливом зерна и маскировка эффекта транслокацией 1RS.1BL

Пластидная глутаминсинтетаза GS2 отвечает за первичную ассимиляцию аммония в хлоропластах и за реассимиляцию азота, освобождающегося при фотодыхании и при деградации белков в ходе старения листа [37,94]; цитозольные и пластидные изоформы выполняют при этом различные функции [154]. Для пшеницы показана связь изоферментного состава GS с азотной эффективностью [9], для твёрдой пшеницы – связь генов GS2 с содержанием белка в зерне [10], а сверхэкспрессия цитозольной GS у ячменя повышала эффективность использования азота [95]; цитозольная GS рассматривается как самостоятельная цель улучшения азотной эффективности культур [38]. Настоящая работа добавляет к этому то, чего в перечисленных исследованиях нет: оценку вклада естественного аллельного варианта *TaGS2-2A* в признаки продуктивности на крупной коллекции отечественного материала.

Выявленная делеция 10 п. н. в промоторной области – вариант регуляторного, а не кодирующего типа, и ожидаемое следствие такого варианта – изменение уровня, а не структуры белка. Наблюдаемый спектр ассоциаций этому соответствует: аллель *TaGS2-2Aa* ассоциирован с большей массой зерна с колоса и большей урожайностью на коллекции озимой пшеницы в 2023 году, а также на коллекции яровой пшеницы в 2022 году с массой зерна в колосе и массой 1000 зерен. Иными словами, вклад локуса реализуется преимущественно через налив зерна, а не через вегетативный рост, что ожидаемо для гена, активность которого у

злаков смещается после цветения к ремобилизации азота [94,154], и что делает результат внутренне согласованным с известной физиологией GS2.

В 2023 году на яровой пшенице и в 2024 году на озимой различия между генотипами были в целом менее выражены, и по многим признакам значимости не достигли. Причина, вероятнее всего, средовая: климатические условия и тип развития растения существенно влияют на экспрессию генов азотного обмена и на ассимиляцию азота. Для селекции это означает, что ожидаемая прибавка по маркеру *rGS-2A* реализуется не в каждый год, и оценивать её нужно по многолетним данным.

Наиболее интересный результат раздела – маскирование эффекта транслокацией 1RS.1BL: различия между *TaGS2-2Aa* и *TaGS2-2Ab* выражены сильнее у растений, не несущих транслокацию. Объяснение состоит в том, что собственный эффект 1RS.1BL на продуктивность превосходит эффект локуса *TaGS2-2A*: транслокация положительно влияет на элементы продуктивности, повышает устойчивость к патогенам и засухоустойчивость и замедляет старение листа [17], а её распространённость в российской селекции высока – в изученной коллекции яровой пшеницы она обнаружена у 78% сортов [16]. Отсюда прямая рекомендация, которую следует внести в практические предложения: отбор по маркеру *rGS-2A* целесообразно вести в материале, не несущем 1RS.1BL, а в материале с транслокацией ожидать прибавки от этого локуса не следует. Наиболее продуктивным сочетанием в изученной коллекции оказалось *TaGS2-2Aa* + 1RS.1BL [16], то есть транслокация полезна сама по себе, но обесценивает выбор аллеля *TaGS2-2A*.

Следует также оговорить, что в опубликованной ранее работе на этой же коллекции анализ включал третий фактор – аллельное состояние гена *VRN-B1*, влияющее на сроки колошения и элементы продуктивности [16]; в настоящем разделе рассматривается взаимодействие *TaGS2-2A* с транслокацией 1RS.1BL, а эффекты *VRN-B1* приведены в указанной публикации.

4.7 *TaNGR5-1B*: ассоциация с урожайностью и ограничения интерпретации

Ген *NGR5* – один из наиболее интересных объектов в контексте задачи повышения азотной эффективности: у риса он опосредует азот-зависимое кущение, стабилизируется белками DELLA и деградирует при гиббереллиновом сигналинге, а его повышенное содержание у полумкарликовых сортов «зелёной революции» позволяет увеличить урожайность при сниженных дозах азота через азот-зависимую модификацию хроматина комплексом PRC2 [24]. Настоящая работа впервые характеризует аллельное состояние этого локуса у отечественных сортов пшеницы.

В результате секвенирования было установлено, что ген *TaNGR5-1D* в изученной панели практически мономорфен – обнаружены лишь две однонуклеотидные замены в некодирующих областях у сортов Безостая 100 и Новосибирская 67. Столь высокая консервативность сама по себе является содержательным результатом и согласуется с представлением о ключевой регуляторной роли этого гена. Как следствие, маркер был разработан не на сам *TaNGR5-1D*, а на индел 4 п. н. в промоторной области гомеолога *TaNGR5-1B*, и все дальнейшие ассоциации относятся к этому гомеологу.

Ассоциативный анализ 892 образцов дал самый крупный по величине эффект во всей работе: аллель *pNGR5-1Ba* связан с более высокой урожайностью во всех трёх локациях – на 50 г/м² в Кургане, 78,7 г/м² в Омске и 116,5 г/м² в Челябинске, что относительно носителей аллеля *pNGR5-1Bb* составляет соответственно 15,7 %, 31,2 % и 38,7 %, а также с большей массой 10 колосьев, массой зерна с 10 колосьев и массой 1000 зёрен при удлинении периода до созревания на 1,6–2,1 дня (Таблица 24). Направление эффекта воспроизвелось во всех трёх точках, что говорит против случайного результата.

Однако исследование имеет ряд ограничений, которые могут вызывать искажение результата. Во-первых, аллель *pNGR5-1Ba* редок, а коллекция составная

– она сформирована независимо в шести селекционных и научных учреждениях. При такой структуре редкий аллель почти всегда частично сцеплен с происхождением образцов, и часть наблюдаемой прибавки может объясняться различием селекционных программ, а не самим локусом. Во-вторых, прибавка урожайности порядка 30% от одного локуса превышает типичные оценки для отдельных генов-кандидатов у пшеницы, где вклад одного локуса в урожайность редко превосходит 5–10 %; такая величина заставляет предполагать либо сцепление маркера с более крупным эффектом, либо смещение из-за структуры выборки. Наиболее вероятное объяснение, согласующееся с литературой [24], состоит в том, что промоторный индел меняет уровень экспрессии *TaNGR5-1B*, а реализация этого различия зависит от статуса DELLA – то есть от аллелей *Rht*, распределение которых по изученным коллекциям в работе не охарактеризовано. Необходимо проведение дополнительного исследования на имеющемся материале с учетом аллельного состояния генов *Rht-B1* и *Rht-D1*.

Удлинение периода до созревания на 1,6–2,1 дня при одновременном росте урожайности означает более длительный налив зерна, что физиологически согласуется с ролью *NGR5* в азот-зависимом продлении вегетативной активности [24], но в условиях Западной Сибири и Южного Урала может быть рискованным при ранних заморозках.

4.8 *TaAMT-2B*: связь с белковостью зерна и проблема разграничения поглощения и разбавления азота

Транспортёры аммония семейства АМТ обеспечивают поглощение аммония корнем и участвуют в различных аспектах роста и развития [11]; у высших растений сосуществуют системы транспорта с высоким и низким сродством, а сдвиг соотношения $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ вызывает лигнификацию корней и снижает использование азота. Для пшеницы разнообразие последовательностей, кодирующих АМТ, охарактеризовано лишь в первом приближении, и данный раздел работы восполняет этот пробел на отечественном материале.

Секвенирование выявило контрастную картину: подавляющее большинство изученных сортов по гену *TaAMT-2B* идентичны референсу, а весь спектр полиморфизмов сосредоточен у одного сорта – Алексеич, у которого обнаружены четыре однонуклеотидные замены и вставка 5 п. н. в промоторе, две синонимичные замены в кодирующей области, инделы в 3'-нетранслируемой области и терминаторе, а также крупная делеция размером 160 п.н. Совокупность промоторных и 3'-UTR вариантов позволяет предполагать изменение уровня экспрессии, однако прямых данных об экспрессии работа не содержит, и утверждение о возможном нокауте гена следует изложить как гипотезу.

Ассоциативный анализ показал ассоциацию аллельных вариантов с массой 1000 зёрен на коллекции яровой пшеницы (преимущество аллеля *rAMT-2Bb* в оба года: +2,38 г, или 6,8 %, в 2022 году и +3,42 г, или 9,7 %, в 2023 году) и с массой зерна с колоса в 2023 году, а также – что для настоящей работы особенно важно – с содержанием белка в зерне: носители альтернативного аллеля *rAMT-2Ba* превосходили носителей *rAMT-2Bb* на 0,52 процентного пункта (13,70 % против 13,18 %; $p = 0,024$; Москва, 2020, Таблица 27). Содержание белка напрямую связано с азотным обменом растения, что делает этот результат особо ценным.

Обнаруженное направление эффектов воспроизводит классическое отрицательное соотношение между массой зерна и его белковостью: аллель, связанный с большей массой 1000 зёрен, связан с меньшим содержанием белка, и наоборот. Такое соотношение обычно объясняется разбавлением азота увеличенным пулом углеводов, а не изменением поглощения азота, и потому наблюдаемая картина не позволяет пока утверждать, что *TaAMT-2B* влияет именно на поглощение аммония. Для уточнения полученных результатов в дальнейших исследованиях необходимо измерить общий вынос азота с урожаем, а не только концентрацию белка.

Практическое значение результата состоит в том, что маркер *rAMT-2B* позволяет вести направленный отбор по одному из двух альтернативных направлений – на массу зерна или на белковость – в зависимости от задачи

селекционной программы, что для сортов хлебопекарного назначения особенно существенно.

4.9 Асимметрия аллельного разнообразия гомеологов генов азотного обмена

Работа охватывает два полных гомеологических ряда, *TaPARG* (2A, 2B, 2D) и *TaGRF9* (6A, 6B, 6D), и неполный ряд *TaBT2* (3A, 3D). В обоих полных рядах обнаруживается один и тот же порядок: полиморфизм сосредоточен в одном гомеологе, тогда как остальные либо несут единичные нейтральные замены, либо мономорфны во всей панели. В ряду *TaPARG* полиморфен гомеолог 2A (несинонимичная замена, замены в UTR и межгенных областях), гомеолог 2B несёт только вариацию длины микросателлита в шестом интроне, а 2D мономорфен. В ряду *TaGRF9* полиморфен 6A, гомеолог 6B несёт синонимичную замену и одну нейтральную по прогнозу PROVEAN аминокислотную замену, а 6D мономорфен. В ряду *TaBT2* оба гомеолога высококонсервативны, а различия ограничены сопоставлением с посторонними геномами.

Существует два возможных объяснения подобной организации аллельного разнообразия, и они не исключают друг друга. Первое – различие в силе отбора: гомеолог, вносящий основной вклад в признак, находится под более сильным давлением, и разнообразие в нём поддерживается селекцией, тогда как «резервные» гомеологи либо накапливают нейтральные замены, либо, наоборот, сохраняются консервативными, если участвуют в критических функциях. Второе – история формирования отечественного селекционного материала: интенсивный отбор в пределах узкой группы родительских форм мог исчерпать разнообразие в части гомеологов. Различить два объяснения можно, сопоставив уровень полиморфизма изученных гомеологов в отечественной панели с данными панелей мирового разнообразия (например, экзомными данными коллекций пшеницы), и это естественная задача следующего этапа.

Среди выявленных полиморфизмов, на которые удалось разработать маркеры, преобладают расположенные в промоторах, интронах и нетранслируемых областях, а не в кодирующей последовательности. Для генов регуляторного типа, каковыми являются *NLP3*, *GRF9*, *NGR5* и *BT2*, это ожидаемо: изменение уровня экспрессии регулятора переносится растением легче, чем изменение структуры белка, и потому именно регуляторные варианты сохраняются в культуре. Практическое следствие существенно: поиск полезной вариации в таких генах следует вести секвенированием промоторных и интронных областей, а не только кодирующей части, как это и было сделано в настоящей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа охватила двенадцать генов-кандидатов, связанных с азотным обменом и регуляцией роста, у мягкой пшеницы и тритикале. Для каждого выполнено секвенирование на панели сортов и биоинформатический анализ полиморфизмов; для восьми генов созданы диагностические маркеры; аллельное состояние определено в коллекциях; связь аллельных вариантов с хозяйственно-ценными признаками оценена методами ассоциативной генетики.

Главный итог работы не в перечне маркеров, а в том, что он показал: эффект аллельного варианта гена азотного обмена не является собственным свойством этого варианта – он определяется генетическим фоном. Работа установила это на четырех разных генах, в двух разных популяциях.

Первое: знак эффекта может меняться на противоположный. Аллель *GRF9-6Ab* у тритикале в присутствии гена короткостебельности *Ddw1* увеличивает массу зерна главного колоса на 19,2 % и 16,9 % в двух средах, а в его отсутствие – снижает её на 8,6 % и 3,5 % [142]. Один и тот же аллель на одном и том же материале в один и тот же год даёт противоположный результат в зависимости от того, какой аллель гена короткостебельности несёт растение.

Второе: эффект может быть полностью замаскирован интрогрессией. У растений с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL различия между аллелями гена *TaGS2-2A* статистически незначимы в оба года наблюдений, тогда как у растений без транслокации они достигают 18–56 % по массе зерна с колоса [16]. В изученной коллекции транслокация присутствует у 78% образцов [16] – то есть у подавляющего большинства материала эффект гена был бы не обнаружен вовсе.

Третье: эффект на признак может проявляться только через взаимодействие. Полиморфизм гена *TaNLP3-3B* достоверно не влияет на массу зерна с колоса, число зёрен, массу 1000 зёрен и индекс урожайности [140], однако его взаимодействие с геном *Ppd-D1* достоверно по длине первого междоузлия ($p = 4,5 \times 10^{-5}$), числу зёрен в главном колосе ($p = 4,1 \times 10^{-5}$), числу зёрен в колоске ($p = 9,6 \times 10^{-5}$) и дате

цветения ($p = 1,3 \times 10^{-5}$) [140]. При одном аллеле *TaNLP3-3B* ген *Ppd-D1* увеличивает число зёрен на 1,8 зерна (7 % от среднего), при другом снижает его [140].

Из этого следует практический вывод: маркер на ген азотного обмена сам по себе не является инструментом отбора. Он становится им только вместе с маркерами на гены генетического фона – короткостебельности, фотопериодической чувствительности и интрогрессий. Работа даёт восемь таких маркеров и четыре установленных взаимодействия, в которых их следует применять.

Отдельный результат – отрицательный: для гомеологов *TaGRF9-6B* и *TaGRF9-6D* достоверных ассоциаций с изученными признаками не выявлено. Возможные причины – функциональная избыточность гомеологов и недостаточная статистическая мощность выборки. Отрицательный результат по гомеологам согласуется с положительным по гену *TaGRF9-6A*: эффект несёт именно тот гомеолог, у которого изменён промотор.

Рекомендации по использованию результатов

При отборе форм тритикале, несущих ген короткостебельности *Ddw1*, применять маркер на делецию 12 п.н. в промоторе гена *TaGRF9-6A* (продукты 203 и 191 п.н.) [142]. В отсутствие *Ddw1* этот отбор бесполезен и вреден: тот же аллель без *Ddw1* снижает массу зерна главного колоса [142].

При оценке гена *TaGS2-2A* в коллекциях предварительно определять наличие транслокации 1RS.1BL маркером SCM9 [16] и вести анализ отдельно по группам с транслокацией и без неё.

При отборе на скороспелость KASP-маркер на ген *TaNLP3-3B* даёт выигрыш в 2 дня по колошению и цветению без потери компонентов продуктивности [140] и применим независимо от аллельного состояния гена *Ppd-D1*.

При отборе на скороспелость использовать маркер BT2-3A совместно с маркером на *Ppd-D1*, чтобы избежать задержки наступления колошения за счет синергетического взаимодействия их аллелей.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проверить функциональность аллеля «C» гена *TaPARG-2A*: прогноз PROVEAN (score $-4,749$) указывает на вероятную утрату функции [139], но экспериментального подтверждения нет. Требуется анализ экспрессии либо оценка активности белка.

Оценить эффект аллеля *TaGS2-2Aa* не менее чем за три года: полученные различия по трём из четырёх признаков достоверны в 2022 г. и недостоверны в 2023 г. [16], что не позволяет отличить эффект гена от эффекта года.

Повторить оценку эффектов генов *TaNGR5-1B* и *TaAMT-2B* на независимом материале и с отдельным учётом локаций: имеющиеся оценки получены усреднением по средам и требуют подтверждения.

Расширить анализ взаимодействий: работа установила четыре пары взаимодействующих локусов; систематический перебор пар «ген азотного обмена – ген генетического фона» не проводился.

Оценить пригодность созданных маркеров для практического отбора: провести маркер-опосредованный отбор на реальном селекционном материале и сопоставить результат с фенотипическим отбором.

ВЫВОДЫ

1. Аллельное разнообразие генов азотного обмена в отечественном селекционном материале пшеницы и тритикале сохранилось, но распределено неравномерно. В гомеологических рядах *TaPARG* и *TaGRF9* оно сосредоточено в одном гомеологе (*TaPARG-2A*, *TaGRF9-6A*), а в пределах генов приходится главным образом на промоторные, интронные и нетранслируемые области. Следовательно, поиск хозяйственно-ценной изменчивости в генах этой группы необходимо вести с обязательным анализом регуляторных областей, а не только кодирующей последовательности.

2. Вклад аллеля гена азотного обмена в хозяйственно-ценные признаки не является постоянным свойством аллеля и определяется генетическим фоном. Ген короткостебельности может менять знак эффекта аллеля (*TaGRF9-6A* × *Ddw1*), крупная интрогрессия – полностью маскировать его (*TaGS2-2A* × *1RS.1BL*), а ген фотопериодической чувствительности – быть условием его проявления (*TaBT2-3A* × *Ppd-D1*). Поэтому оценки эффектов, полученные на одном генетическом фоне, нельзя переносить на другой.

3. Природная изменчивость генов семейства GRF позволяет компенсировать плеiotропные потери, связанные с короткостебельностью. У тритикале аллель *GRF9-6Ab* в фоне *Ddw1* устраняет два основных недостатка этого гена – снижение массы зерна колоса и задержку колошения. Компенсация зависит от условий среды и устойчиво проявляется в условиях Центрального Нечерноземья.

4. Ген *TaNLP3-3B* или сцепленный с ним участок хромосомы 3В участвует в регуляции сроков колошения и цветения пшеницы независимо от гена *Ppd-D1* и без ущерба для компонентов продуктивности. Это делает маркер на полиморфизм с.1824+137G>A инструментом регулирования скороспелости, дополняющим аллели *Ppd-D1*.

5. Промоторный вариант гена пластидной глутаминсинтетазы *TaGS2-2A* влияет на продуктивность преимущественно через налив зерна, что согласуется с ролью фермента в перераспределении азота в зерно. Поскольку эффект этого локуса маскируется транслокацией 1RS.1BL, присутствующей у 78% образцов коллекции яровой пшеницы Западной Сибири, отбор по нему в этом регионе эффективен только в материале без транслокации.

6. Промоторный вариант гомеолога *TaNGR5-1B* связан с наиболее крупными в работе прибавками урожайности, воспроизводимыми в трех регионах и сопряженными с удлинением периода до созревания. Это указывает на гены *NGR5* пшеницы, как и риса, как на перспективный источник повышения продуктивности.

7. *TaAMT-2B* – единственный из изученных генов, аллели которого связаны с содержанием белка в зерне. Однако разнонаправленность их эффектов на массу 1000 зерен и на белковость указывает скорее на разбавление азота в зерне, чем на изменение его поглощения.

8. Аллель «С» гена *TaPARG-2A* в отечественном материале встречается у единичных образцов (4 из 805), что согласуется с гипотезой о его вытеснении в ходе отечественной селекции.

9. Разработанные маркеры на гены азотного обмена становятся инструментом отбора только в сочетании с маркерами генов фона – генов короткостебельности, *Ppd-D1* и транслокации 1RS.1BL.

Список сокращений

- 1RS.1BL – пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL
- 1BS.1BL – отсутствие транслокации (нормальные хромосомы)
- AlaAT (Alanine Aminotransferase) – аланинаминотрансфераза
- AMT (Ammonium Transporter) – транспортер аммония
- ANOVA (Analysis of Variance) – дисперсионный анализ
- ASN (Asparagine Synthetase) – аспарагинсинтетаза
- BT2 (BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 2)* – ген кодирующий белок 2, содержащий домены BTB/POZ и TAZ
- CEP (C-terminally Encoded Peptide) – пептид, кодируемый на С-конце
- CEPR (CEP Receptor) – рецептор CEP
- CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9) – система редактирования генома
- Ddw1 (Dominant dwarf 1)* – доминантный ген карликовости 1
- FDR (False Discovery Rate) – доля ложных обнаружений
- GDH (Glutamate Dehydrogenase) – глутаматдегидрогеназа
- GLM (General Linear Model) – общая линейная модель
- GOGAT (Glutamate Synthase) – глутаматсинтаза
- GPC (Grain Protein Content) – содержание белка в зерне
- GRF (Growth-Regulating Factor) – фактор регуляции роста
- GS (Glutamine Synthetase) – глутаминсинтетаза
- GWAS (Genome-Wide Association Study) – полногеномный ассоциативный анализ
- HATS (High-Affinity Transport System) – система транспорта с высоким сродством
- HTP (High-Throughput Phenotyping) – высокопроизводительное фенотипирование

HTG (High-Throughput Genotyping) – высокопроизводительное генотипирование

KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR) – конкурентная аллель-специфичная ПЦР

LATS (Low-Affinity Transport System) – система транспорта с низким сродством

lncRNA (long non-coding RNA) – длинная некодирующая РНК

MAS (Marker-Assisted Selection) – маркер-ориентированная селекция

miRNA (microRNA) – микроРНК

NGR (Nitrogen-mediated Growth Regulator) – азот-опосредованный регулятор роста

NiR – нитритредуктаза

NLP (NIN-like Protein) – NIN-подобный белок

NPF (NRT1/PTR Family) – семейство транспортеров нитратов/пептидов

NR – нитратредуктаза

NRT (Nitrate Transporter) – транспортер нитрата

NUE (Nitrogen Use Efficiency) – эффективность использования азота

NUPE (Nitrogen Uptake Efficiency) – эффективность поглощения азота

NUtE (Nitrogen Utilization Efficiency) – эффективность утилизации азота

OPT (Oligopeptide Transporter) – транспортер олигопептидов

PARG (Plant Architecture-Related Gene) – ген, связанный с архитектурой растений

PCR (Polymerase Chain Reaction) – полимеразная цепная реакция

Ppd – ген фотопериодической чувствительности

PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) – поликомб-репрессивный комплекс

2

QTL (Quantitative Trait Locus) – локус количественного признака

Rht – ген короткостебельности

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

Vrn – ген яровизации

КАСИБ – Казахстанско-Сибирская сеть по улучшению яровой пшеницы

Список литературы

1. Прянишников Д. Н. Азот в жизни растений и в земледелии СССР. М; Л.: Издательство Академии Наук СССР, 1945.
2. Li J. и др. Genetic and molecular mechanisms underlying nitrogen use efficiency in maize // J. Genet. Genomics. Elsevier, 2025. Т. 52, № 3. С. 276–286.
3. Hirel B. и др. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches // J. Exp. Bot. Oxford University Press, 2007. Т. 58, № 9. С. 2369–2387.
4. Han M. и др. The genetics of nitrogen use efficiency in crop plants // Annu. Rev. Genet. Annual Reviews, 2015. Т. 49, № 1. С. 269–289.
5. Xu G., Fan X., Miller A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency // Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews, 2012. Т. 63. С. 153–182.
6. Garnett T. и др. Genetic approaches to enhancing nitrogen-use efficiency (NUE) in cereals: challenges and future directions // Funct. Plant Biol. CSIRO Publishing, 2015. Т. 42, № 10. С. 921–941.
7. Li B. и др. Two novel AP2/EREBP transcription factor genes TaPARG have pleiotropic functions on plant architecture and yield-related traits in common wheat // Front. Plant Sci. Frontiers Media SA, 2016. Т. 7. С. 1191.
8. Мохов Т. и др. РАЗРАБОТКА KASP-МАРКЕРА НА ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНЕ PARG-2A У TRÍTICUM AESTÍVUM // Биотехнология В Растениеводстве Животноводстве И Сельскохозяйственной Микробиологии. 2023. Т. 14. С. 28.
9. Zhang Z. и др. The role of glutamine synthetase isozymes in enhancing nitrogen use efficiency of N-efficient winter wheat // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK London, 2017. Т. 7, № 1. С. 1000.
10. Gadaleta A. и др. The glutamine synthetase (GS2) genes in relation to grain protein content of durum wheat // Funct. Integr. Genomics. Springer, 2011. Т. 11, № 4. С. 665–670.

11. Wang Y. и др. Genome-Wide Identification of the AMT Gene Family in Wheat: Expression Profiles Under Ammonium Nutrition and Pathogen Effects // *Genes*. MDPI, 2025. Т. 16, № 12. С. 1451.
12. Li S. и др. Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture // *Nature*. Nature Publishing Group UK London, 2018. Т. 560, № 7720. С. 595–600.
13. Tenhola-Roininen T., Tanhuanpää P. Tagging the dwarfing gene Ddw1 in a rye population derived from doubled haploid parents // *Euphytica*. Springer, 2010. Т. 172, № 3. С. 303–312.
14. Guo Z. и др. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat Ppd-D1 gene // *New Phytol.* Wiley Online Library, 2010. Т. 185, № 3. С. 841–851.
15. Kalih R. и др. Effect of a rye dwarfing gene on plant height, heading stage, and Fusarium head blight in triticale (*Triticosecale* Wittmack) // *Theor. Appl. Genet.* Springer, 2014. Т. 127, № 7. С. 1527–1536.
16. Chernook A. и др. Study of the Influence of the Glutamine Synthetase Gene on Agronomically Valuable Traits in Spring Bread wheat in Western Siberia // *Nanobiotechnology Rep.* Springer, 2024. Т. 19, № 5. С. 796–807.
17. Moskal K. и др. The pros and cons of rye chromatin introgression into wheat genome, *Agronomy*, 2021, vol. 11, no. 3.
18. Li Z. и др. The Arabidopsis CPSF30-L gene plays an essential role in nitrate signaling and regulates the nitrate transceptor gene NRT 1.1 // *New Phytol.* Wiley Online Library, 2017. Т. 216, № 4. С. 1205–1222.
19. Li X.-P. и др. Haplotype analysis of the genes encoding glutamine synthetase plastic isoforms and their association with nitrogen-use-and yield-related traits in bread wheat // *New Phytol.* Wiley Online Library, 2011. Т. 189, № 2. С. 449–458.
20. Hu M. и др. Transgenic expression of plastidic glutamine synthetase increases nitrogen uptake and yield in wheat // *Plant Biotechnol. J.* Wiley Online Library, 2018. Т. 16, № 11. С. 1858–1867.

21. Liu K.-H. и др. NIN-like protein 7 transcription factor is a plant nitrate sensor // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2022. Т. 377, № 6613. С. 1419–1425.
22. Marchive C. и др. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London, 2013. Т. 4, № 1. С. 1713.
23. Wu J. и др. The OsNLP3/4-OsRFL module regulates nitrogen-promoted panicle architecture in rice // *New Phytol.* Wiley Online Library, 2023. Т. 240, № 6. С. 2404–2418.
24. Wu K. и др. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2020. Т. 367, № 6478. С. eaaz2046.
25. Araus Caramori V. и др. Members of BTB Gene Family of Scaffold Proteins Suppress Nitrate Uptake and Nitrogen Use Efficiency. 2016.
26. Bazhenov M. S. и др. The association of grain yield and agronomical traits with genes of plant height, photoperiod sensitivity and plastid glutamine synthetase in winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) collection // *Int. J. Mol. Sci.* MDPI, 2022. Т. 23, № 19. С. 11402.
27. Kou Y.-C. и др. Plant nitrate transport family NPF and its regulatory mechanism of protein modification. // *Yi Chuan Hered.* 2025. Т. 47, № 10. С. 1118–1131.
28. Guo X. и др. Regulatory network of ammonium and nitrate uptake and utilization in rice // *Front. Plant Sci.* Frontiers Media SA, 2025. Т. 16. С. 1656041.
29. Wen Z. и др. Maize NPF6 proteins are homologs of Arabidopsis CHL1 that are selective for both nitrate and chloride // *Plant Cell*. American Society of Plant Biologists, 2017. Т. 29, № 10. С. 2581–2596.
30. Siddiqui M. N. и др. Convergently selected NPF2. 12 coordinates root growth and nitrogen use efficiency in wheat and barley // *New Phytol.* Wiley Online Library, 2023. Т. 238, № 5. С. 2175–2193.
31. Porras Murillo R. Transporters mediating ammonium uptake in plants and their regulation by the abiotic stress signaling pathway. 2023.

32. Chattha M. S. и др. Enhancement of nitrogen use efficiency through agronomic and molecular based approaches in cotton // *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*, 2022. Т. 13. С. 994306.
33. Tunnermann L. Organic nitrogen: molecular regulation of uptake and physiological implications: PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, 2025. № 2025:65.
34. Chen C.-Z. и др. Arabidopsis NRT1. 5 is another essential component in the regulation of nitrate reallocation and stress tolerance // *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*, 2012. Т. 159, № 4. С. 1582–1590.
35. Feng H. и др. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status // *J. Exp. Bot. Oxford University Press*, 2011. Т. 62, № 7. С. 2319–2332.
36. Tegeder M., Masclaux-Daubresse C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use // *New Phytol. Wiley Online Library*, 2018. Т. 217, № 1. С. 35–53.
37. Lea P. J., Mifflin B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement // *Annu Plant Rev Vol. Wiley Online Library*, 2011. Т. 42. С. 1–40.
38. Thomsen H. C. и др. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? // *Trends Plant Sci. Elsevier*, 2014. Т. 19, № 10. С. 656–663.
39. Boisson M. и др. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet. Springer*, 2005. Т. 110, № 5. С. 932–940.
40. Anjana и др. Modulation of nitrogen-utilization efficiency in wheat genotypes differing in nitrate reductase activity // *J. Plant Nutr. Taylor & Francis*, 2011. Т. 34, № 6. С. 920–933.
41. Zhao X.-Q., Nie X.-L., Xiao X.-G. Over-expression of a tobacco nitrate reductase gene in wheat (*Triticum aestivum* L.) increases seed protein content and weight without augmenting nitrogen supplying // *PloS One. Public Library of Science San Francisco, USA*, 2013. Т. 8, № 9. С. e74678.

42. Diatloff E. и др. The vegetative nitrogen response of sorghum lines containing different alleles for nitrate reductase and glutamate synthase // *Mol. Breed.* Springer, 2017. Т. 37, № 11. С. 138.
43. Gao Z. и др. The indica nitrate reductase gene OsNR2 allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London, 2019. Т. 10, № 1. С. 5207.
44. Nakano S. и др. Structure–function relationship of assimilatory nitrite reductases from the leaf and root of tobacco based on high-resolution structures // *Protein Sci. Wiley Online Library*, 2012. Т. 21, № 3. С. 383–395.
45. Beatty P. H., Good A. G. Improving nitrogen use efficient in crop plants using biotechnology approaches // *Engineering nitrogen utilization in crop plants.* Springer, 2018. С. 15–35.
46. Németh E., Nagy Z., Pécsváradi A. Chloroplast glutamine synthetase, the key regulator of nitrogen metabolism in wheat, performs its role by fine regulation of enzyme activity via negative cooperativity of its subunits // *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*, 2018. Т. 9. С. 191.
47. Bernard S. M. и др. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Mol. Biol.* Springer, 2008. Т. 67, № 1. С. 89–105.
48. Shrawat A. K. и др. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase // *Plant Biotechnol. J. Wiley Online Library*, 2008. Т. 6, № 7. С. 722–732.
49. Habash D. Z. и др. The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat: N utilisation, development and yield // *Theor. Appl. Genet.* Springer, 2007. Т. 114, № 3. С. 403–419.
50. Lea P. J., Mifflin B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement // *Annu Plant Rev Vol.* Wiley Online Library, 2011. Т. 42. С. 1–40.
51. Labboun S. и др. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. in vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments // *Plant Cell Physiol.* Oxford University Press, 2009. Т. 50, № 10. С. 1761–1773.

52. Fontaine J.-X. и др. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism // *Plant Cell*. American Society of Plant Biologists, 2012. T. 24, № 10. С. 4044–4065.
53. Tercé-Laforgue T. и др. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. Physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually or simultaneously. // *Plant Cell Physiol*. 2013. T. 54, № 10. С. 1635.
54. Enomoto T. и др. STOP1 regulates the expression of HsfA2 and GDH s that are critical for low-oxygen tolerance in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* Oxford University Press UK, 2019. T. 70, № 12. С. 3297–3311.
55. Hirel B., Lea P. J. Genomics of nitrogen use efficiency in maize: from basic approaches to agronomic applications // *The Maize Genome*. Springer, 2018. С. 259–286.
56. Grabowska A. и др. Molecular cloning and functional analysis of the second gene encoding glutamate dehydrogenase in triticale // *Acta Physiol. Plant*. Springer, 2017. T. 39, № 1. С. 24.
57. Abiko T. и др. Changes in nitrogen assimilation, metabolism, and growth in transgenic rice plants expressing a fungal NADP (H)-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) // *Planta*. Springer, 2010. T. 232, № 2. С. 299–311.
58. Fontaine J.-X. и др. A quantitative genetic study for elucidating the contribution of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and other nitrogen-related physiological traits to the agronomic performance of common wheat // *Theor. Appl. Genet.* Springer, 2009. T. 119, № 4. С. 645–662.
59. Good A. G. и др. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase // *Botany*. 2007. T. 85, № 3. С. 252–262.
60. Snyman S. и др. Improved nitrogen use efficiency in transgenic sugarcane: phenotypic assessment in a pot trial under low nitrogen conditions // *Plant Cell Rep.* Springer, 2015. T. 34, № 5. С. 667–669.

61. McAllister C. H., Good A. G. Alanine aminotransferase variants conferring diverse NUE phenotypes in *Arabidopsis thaliana* // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, CA USA, 2015. T. 10, № 4. C. e0121830.
62. Peña P. A. и др. Molecular and phenotypic characterization of transgenic wheat and sorghum events expressing the barley alanine aminotransferase // *Planta*. Springer, 2017. T. 246, № 6. C. 1097–1107.
63. Gaufichon L., Rothstein S. J., Suzuki A. Asparagine metabolic pathways in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* Oxford University Press, 2016. T. 57, № 4. C. 675–689.
64. Curci P. L. и др. Asparagine synthetase genes (*AsnS1* and *AsnS2*) in durum wheat: structural analysis and expression under nitrogen stress // *Euphytica*. Springer, 2018. T. 214, № 2. C. 36.
65. Avila-Ospina L. и др. The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence // *J. Exp. Bot.* Oxford University Press UK, 2015. T. 66, № 7. C. 2013–2026.
66. Curci P. L. и др. Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK London, 2017. T. 7, № 1. C. 1176.
67. Yoneyama T. и др. Whole-plant dynamic system of nitrogen use for vegetative growth and grain filling in rice plants (*Oryza sativa* L.) as revealed through the production of 350 grains from a germinated seed over 150 days: a review and synthesis // *Front. Plant Sci.* Frontiers Media SA, 2016. T. 7. C. 1151.
68. Imai K. и др. Changes in the synthesis of Rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx // *Ann. Bot.* Oxford University Press, 2008. T. 101, № 1. C. 135–144.
69. Li G. и др. Nitrogen redistribution during the grain-filling stage and its correlation with senescence and *TaATG8* expression in leaves of winter wheat // *J. Integr. Agric.* Elsevier, 2024.

70. Gong Y.-H. и др. Foliar ¹⁵N-urea absorption and translocation in wheat with contrasting senescence patterns at late growth stage // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK London, 2026. Т. 16, № 1. С. 7174.
71. Kamal N. M. и др. Stay-green trait: a prospective approach for yield potential, and drought and heat stress adaptation in globally important cereals // Int. J. Mol. Sci. MDPI, 2019. Т. 20, № 23. С. 5837.
72. Christopher J. T. и др. Stay-green traits to improve wheat adaptation in well-watered and water-limited environments // J. Exp. Bot. Oxford University Press UK, 2016. Т. 67, № 17. С. 5159–5172.
73. Christopher J. и др. Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat // Aust. J. Agric. Res. CSIRO Publishing, 2008. Т. 59, № 4. С. 354–364.
74. Uauy C. и др. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat // Science. American Association for the Advancement of Science, 2006. Т. 314, № 5803. С. 1298–1301.
75. Derkx A. P. и др. Identification of differentially Senescing mutants of wheat and impacts on yield, biomass and nitrogen Partitioning F // J. Integr. Plant Biol. Wiley Online Library, 2012. Т. 54, № 8. С. 555–566.
76. Thomas H., Ougham H. The stay-green trait // J. Exp. Bot. Oxford University Press UK, 2014. Т. 65, № 14. С. 3889–3900.
77. HASSAN M. A., others. QTL mapping of seedling biomass and root traits under different nitrogen conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Integr. Agric. Elsevier, 2021. Т. 20, № 5. С. 1180–1192.
78. Quraishi U. M. и др. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution // Plant J. Wiley Online Library, 2011. Т. 65, № 5. С. 745–756.
79. Zhang H., Forde B. G. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture // Science. American Association for the Advancement of Science, 1998. Т. 279, № 5349. С. 407–409.

80. Liang C. и др. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences*, 2014. Т. 111, № 27. С. 10013–10018.
81. Alvarez-Buylla E. R. и др. MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms // *New Phytol. Wiley Online Library*, 2019. Т. 223, № 3. С. 1143–1158.
82. Qu B. и др. A wheat CCAAT box-binding transcription factor increases the grain yield of wheat with less fertilizer input // *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*, 2015. Т. 167, № 2. С. 411–423.
83. Castaings L. и др. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis // *Plant J. Wiley Online Library*, 2009. Т. 57, № 3. С. 426–435.
84. Guan P. и др. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences*, 2017. Т. 114, № 9. С. 2419–2424.
85. Jonassen E. M., Sévin D. C., Lillo C. The bZIP transcription factors HY5 and HYH are positive regulators of the main nitrate reductase gene in Arabidopsis leaves, NIA2, but negative regulators of the nitrate uptake gene NRT1. 1 // *J. Plant Physiol. Elsevier*, 2009. Т. 166, № 18. С. 2071–2076.
86. Jonassen E. M., Sandsmark B. A., Lillo C. Unique status of NIA2 in nitrate assimilation: NIA2 expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4 // *Plant Signal. Behav. Taylor & Francis*, 2009. Т. 4, № 11. С. 1084–1086.
87. Zhou X., Khare T., Kumar V. Recent trends and advances in identification and functional characterization of plant miRNAs // *Acta Physiol. Plant. Springer*, 2020. Т. 42, № 2. С. 25.
88. Li H. и др. Identification of microRNAs in rice root in response to nitrate and ammonium // *J. Genet. Genomics. Elsevier*, 2016. Т. 43, № 11. С. 651–661.

89. Zuluaga D. L. и др. Durum wheat miRNAs in response to nitrogen starvation at the grain filling stage // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, CA USA, 2017. Т. 12, № 8. С. e0183253.
90. Yan M. и др. Rice OsNAR2. 1 interacts with OsNRT2. 1, OsNRT2. 2 and OsNRT2. 3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges // Plant Cell Environ. Wiley Online Library, 2011. Т. 34, № 8. С. 1360–1372.
91. Konishi M., Yanagisawa S. Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression // J. Exp. Bot. Oxford University Press, 2014. Т. 65, № 19. С. 5589–5600.
92. Kurai T. и др. Introduction of the ZmDof1 gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions // Plant Biotechnol. J. Wiley Online Library, 2011. Т. 9, № 8. С. 826–837.
93. Castaings L. и др. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis // Plant J. Wiley Online Library, 2009. Т. 57, № 3. С. 426–435.
94. Tabuchi M., Abiko T., Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.) // J. Exp. Bot. Oxford University Press, 2007. Т. 58, № 9. С. 2319–2327.
95. Gao Y., de Bang T. C., Schjoerring J. K. Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO₂ // Plant Biotechnol. J. Wiley Online Library, 2019. Т. 17, № 7. С. 1209–1221.
96. Yamaya T. и др. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice // J. Exp. Bot. Oxford University Press, 2002. Т. 53, № 370. С. 917–925.
97. Nigro D. и др. Characterization of ferredoxin-dependent glutamine-oxoglutarate amidotransferase (Fd-GOGAT) genes and their relationship with grain protein content QTL in wheat // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, USA, 2014. Т. 9, № 8. С. e103869.

98. Nigro D. и др. Structural analysis of the wheat genes encoding NADH-dependent glutamine-2-oxoglutarate amidotransferases and correlation with grain protein content // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, USA, 2013. Т. 8, № 9. С. e73751.
99. Nigro D. и др. Allelic variants of glutamine synthetase and glutamate synthase genes in a collection of durum wheat and association with grain protein content // Diversity. MDPI, 2017. Т. 9, № 4. С. 52.
100. Curci P. L. и др. Asparagine synthetase genes (AsnS1 and AsnS2) in durum wheat: structural analysis and expression under nitrogen stress // Euphytica. Springer, 2018. Т. 214, № 2. С. 36.
101. Lee S. и др. OsASN1 overexpression in rice increases grain protein content and yield under nitrogen-limiting conditions // Plant Cell Physiol. Oxford University Press, 2020. Т. 61, № 7. С. 1309–1320.
102. Осипова С., Островская Р., Третьякова А. Генетические аспекты засухоустойчивости полиплоидных растений на примере пшеницы *Triticum aestivum* L // Физиология Растений. 2022. Т. 69, № 3. С. 272–285.
103. McAllister C. H., Beatty P. H., Good A. G. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status // Plant Biotechnol. J. Wiley Online Library, 2012. Т. 10, № 9. С. 1011–1025.
104. Tiong J. и др. Improving nitrogen use efficiency through overexpression of alanine aminotransferase in rice, wheat, and barley // Front. Plant Sci. Frontiers Media SA, 2021. Т. 12. С. 628521.
105. Jiao B. и др. Special expression of alanine-aminotransferase1 (OsAlaAT1) improves nitrogen utilization in wheat // Crop Sci. Wiley Online Library, 2025. Т. 65, № 1. С. e21436.
106. Ruffel S. и др. Nitrate sensing and signaling in plants: comparative insights and nutritional interactions // Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews, 2025. Т. 76, № 1. С. 25–52.
107. Shanks C. M. и др. Nitrogen sensing and regulatory networks: it's about time and space // Plant Cell. Oxford University Press US, 2024. Т. 36, № 5. С. 1482–1503.

108. Wang X. и др. OsNRT1. 1B-OsCNGC14/16-Ca²⁺-OsNLP3 Pathway: Phosphorylation-Mediated Maintenance of Nitrogen Homeostasis // *Adv. Sci.* Wiley Online Library, 2025. Т. 12, № 43. С. e07919.
109. Sun X. и др. Nitrogen-driven orchestration of lateral root development: molecular mechanisms and systemic integration // *Biology*. MDPI, 2025. Т. 14, № 8. С. 1099.
110. Nejamkin A. и др. Nitric oxide is required for primary nitrate response in arabidopsis: evidence for S-nitrosation of NLP7 // *Antioxid. Redox Signal.* SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 2025. Т. 42, № 4–6. С. 280–291.
111. Kong L. и др. Signaling responses to N starvation: focusing on wheat and filling the putative gaps with findings obtained in other plants. A review // *Front. Plant Sci.* Frontiers Media SA, 2021. Т. 12. С. 656696.
112. Artins A. и др. Sensing and regulation of C and N metabolism—novel features and mechanisms of the TOR and SnRK1 signaling pathways // *Plant J.* Wiley Online Library, 2024. Т. 118, № 5. С. 1268–1280.
113. Fischer H. D., Fernie A., Skirycz A. Using protein–metabolite interactions to identify novel plant metabolite receptors // *Phytochem. Rev.* Springer, 2025. Т. 24, № 4. С. 2501–2526.
114. Fañanás-Pueyo I. и др. Signalling and regulation of plant development by carbon/nitrogen balance // *Physiol. Plant.* Wiley Online Library, 2025. Т. 177, № 2. С. e70228.
115. Luo L., Zhang Y., Xu G. How does nitrogen shape plant architecture? // *J. Exp. Bot.* Oxford University Press UK, 2020. Т. 71, № 15. С. 4415–4427.
116. Kou H. и др. Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.) // *J. Plant Physiol.* Elsevier, 2011. Т. 168, № 14. С. 1685–1693.
117. Meng X. и др. Chromatin remodeling protein ZmCHB101 regulates nitrate-responsive gene expression in maize // *Front. Plant Sci.* Frontiers Media SA, 2020. Т. 11. С. 52.

118. Zhang H., Zhang X., Xiao J. Epigenetic regulation of nitrogen signaling and adaptation in plants // *Plants*. MDPI, 2023. T. 12, № 14. С. 2725.
119. Zhang H. и др. Epigenetic modifications mediate cultivar-specific root development and metabolic adaptation to nitrogen availability in wheat // *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2023. С. 2023–02.
120. Gao Y. и др. MYB61 is regulated by GRF4 and promotes nitrogen utilization and biomass production in rice // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London, 2020. T. 11, № 1. С. 5219.
121. Singh G. и др. Advances in genomics-assisted breeding strategies for enhancing nutrient uptake and use efficiency in cereals: A pathway toward sustainable agriculture // *Plant Stress*. Elsevier, 2025. С. 101002.
122. Emam A. I. I. и др. Genetic variation and genome-wide association analysis of nitrogen use efficiency-related traits under combined heat and nitrogen-deficient stress in an *Aegilops tauschii*-derived wheat population // *Front. Plant Sci.* Frontiers Media SA, 2025. T. 16. С. 1621916.
123. Govta N. и др. Nitrogen deficiency tolerance conferred by introgression of a QTL derived from wild emmer into bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* Springer, 2024. T. 137, № 8. С. 187.
124. Xu J. и др. Genome-wide association study reveals genomic regions for nitrogen, phosphorus and potassium use efficiency in bread wheat // *J. Integr. Agric.* Elsevier, 2024.
125. Ligeza A., Milner M. J. Understanding the physiological and molecular basis for differences in nitrogen use efficiency in the parents of a winter wheat MAGIC population // *Plants*. MDPI, 2024. T. 13, № 23. С. 3331.
126. Гончарова Ю., Харитонов Е., Шелег В. Молекулярные маркеры генов, определяющих эффективность минерального питания у риса (*Oryza sativa* L.): мини-обзор // *Сельскохозяйственная Биология*. Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология», 2017. Т. 52, № 3. С. 515–525.

127. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* Springer, 1985. Т. 5, № 2. С. 69–76.
128. KB N. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation // *EMBnet News*. 1997. Т. 4. С. 1–4.
129. Баженов М. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ПОДБОР СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ // *Биотехнология В Растениеводстве Животноводстве И Сельскохозяйственной Микробиологии*. 2022. Т. 7. С. 17.
130. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.
131. Zaharia M. и др. Faster and more accurate sequence alignment with SNAP // *ArXiv Prepr. ArXiv11115572*. 2011.
132. Garrison E., Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing // *ArXiv Prepr. ArXiv12073907*. 2012.
133. Danecek P. и др. Twelve years of SAMtools and BCFtools // *Gigascience*. Oxford University Press, 2021. Т. 10, № 2. С. giab008.
134. Robinson J. T. и др. Integrative genomics viewer // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2011. Т. 29, № 1. С. 24–26.
135. Komyshev E., Genaev M., Afonnikov D. Evaluation of the SeedCounter, a mobile application for grain phenotyping // *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*, 2017. Т. 7. С. 1990.
136. Bazhenov M. и др. Isolation of the dwarfing Rht-B1p (Rht17) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker // *Mol. Breed.* Springer, 2015. Т. 35, № 11. С. 213.
137. Beales J. и др. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* Springer, 2007. Т. 115, № 5. С. 721–733.

138. Saal B., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) // *Genome*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 1999. Т. 42, № 5. С. 964–972.

139. Кочешкова А. и др. СОЗДАНИЕ НОВОГО KASP-МАРКЕРА НА АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНА PARG-2A У ПШЕНИЦЫ // Политематический Сетевой Электронный Научный Журнал Кубанского Государственного Аграрного Университета. Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования ..., 2023. № 190. С. 28–38.

140. Bazhenov M. и др. A molecular marker within the NLP3-B1 gene is associated with earliness in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Agronomy*. MDPI, 2024. Т. 14, № 12. С. 2888.

141. Siekmann D. и др. A genome-wide association study pinpoints quantitative trait genes for plant height, heading date, grain quality, and yield in rye (*Secale cereale* L.) // *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*, 2021. Т. 12. С. 718081.

142. Kroupin P. Y. и др. The GRF9-6Ab Allele Compensates for the Pleiotropic Deficits of the Ddw1 Dwarfing Gene in Triticale // *Agronomy*. MDPI, 2025. Т. 15, № 12. С. 2701.

143. GRF9 growth-regulating factor 9 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] - Gene - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/819156> (дата обращения: 02.09.2026).

144. Мохов Т. Д. и др. Гены азотного обмена в структуре урожая рекомбинантных инбредных линий пшеницы // *БИОТЕХНОЛОГИЯ. Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*, 2024. Т. 40, № 7. С. 100.

145. Braun E.-M. и др. Gene expression profiling and fine mapping identifies a gibberellin 2-oxidase gene co-segregating with the dominant dwarfing gene Ddw1 in rye (*Secale cereale* L.) // *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*, 2019. Т. 10. С. 857.

146. Konishi M., Yanagisawa S. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling // *Nat. Commun. Nature Publishing Group UK London*, 2013. Т. 4, № 1. С. 1617.

147. Yan D., Nambara E. Conserved and unique functions of NIN-like proteins in nitrate sensing and signaling // *Plant Sci. Elsevier*, 2023. T. 336. C. 111842.
148. Wang M. и др. Nitrate signaling and its role in regulating flowering time in *Arabidopsis thaliana* // *Int. J. Mol. Sci. MDPI*, 2024. T. 25, № 10. C. 5310.
149. Košner J., Pánková K., others. Effect of chromosome 3B gene/s of Česká Přesívka on vernalisation response, photoperiod sensitivity and earliness of wheat // *Czech J Genet Plant Breed.* 2002. T. 38, № 1. C. 41–49.
150. Le Gouis J. и др. Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat // *Theor. Appl. Genet. Springer*, 2012. T. 124, № 3. C. 597–611.
151. Divashuk M. и др. TaGRF3-2A Improves Some Agronomically Valuable Traits in Semi-Dwarf Spring Triticale // *Plants. MDPI*, 2021. T. 10, № 10. C. 2012.
152. Chernook A. G. и др. Compensatory Effect of the ScGrf3-2R Gene in Semi-Dwarf Spring Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) // *Plants. MDPI*, 2022. T. 11, № 22. C. 3032.
153. Kuijt S. J. и др. Interaction between the GROWTH-REGULATING FACTOR and KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN families of transcription factors // *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*, 2014. T. 164, № 4. C. 1952–1966.
154. Yamaya T., Kusano M. Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice // *J. Exp. Bot. Oxford University Press UK*, 2014. T. 65, № 19. C. 5519–5525.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 Погодные условия в периоды вегетации 2018 и 2019 годов на Московском и Краснодарском опытных участках

Месяц	Москва			Краснодар		
	2018			2018		
	Сумма активных температур (>10 °C), °C	Среднемесячная температура, °C	Осадки, мм	Сумма активных температур (>10 °C), °C	Среднемесячная температура, °C	Осадки, мм
Апрель	–	8,0	37,7	115,5	13,8	27,1
Май	499,1	16,1	43,8	302,8	19,40	43,1
Июнь	516	17,2	54,3	412,5	23,8	10,6
Июль	629,3	20,3	85,3	508	26,3	125,8
Август	613,8	19,8	19,9	489,8	25,8	8,5
Сентябрь	441	14,7	76,1	–	–	–
Суммарно	2699,1	–	317,1	1828,6	–	215,1
	2019			2019		
Апрель	–	8,3	7,6	89,4	11,9	44,2
Май	502,2	16,2	58,3	282	19,1	53,3
Июнь	588	19,6	54,6	472,9	25,3	34,7
Июль	517,7	16,7	63,9	401,6	23	130,3
Август	508,4	16,4	48,3	424,7	23,7	37,2
Сентябрь	372	12,4	32,3	–	–	–
Суммарно	2488,3	–	265	1670,6	–	299,7

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 Условия ПЦР для маркеров, использованных для генотипирования коллекций

Ген	Название маркера	Тип маркера (KASP/ПЦР)	Праймеры (5'→3')	Состав ПЦР-смеси (на 1 реакцию)	Программа амплификации	Размер продукта, п.н.	Литературный источник
<i>Rht17</i>	Rht-B1p	ПЦР	F: 5'-CCATCTCCAGCTGCTCCAGCTTATA -3' R: 5'-CCATCTCCAGCTGCTCCAGCTTATG -3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов: 94°C– 20 сек, 55°C – 1 мин 37°C – 1 мин считывание сигнала	425	Bazhenov et al., 2015
<i>Ddw1</i>	REMS1218	ПЦР	F: 5'-CGCACAAACAAAAACACGAC-3' R: 5'-CAAACAAACCCATTGACACG-3'	70 mM Tris-HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM каждого dNTP, 30 mM праймеров, 0,05 ед/мкл Taq-полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C– 30 сек, 60°C – 30 сек 72°C – 30 сек 72°C – 10 мин	317/321	Tanhola-Roininen and Tanhuanpää, 2010
1BL.1RS	SCM9	ПЦР	F: 5'- TGACAACCCCTTTCCCTCGT -3' R: 5'- TCATCGACGCTAAGGAGGACCC -3'	70 mM Tris-HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ ,	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C– 30 сек, 62°C – 30 сек	200/220	Saal and Wricke, 1999

Ген	Название маркера	Тип маркера (KASP/ПЦР)	Праймеры (5'→3')	Состав ПЦР-смеси (на 1 реакцию)	Программа амплификации	Размер продукта, п.н.	Литературный источник
				0,2 мМ каждого dNTP, 30 мМ праймеров, 0,05 ед/мкл Таq-полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы	72°C – 30 сек 72°C – 10 мин		
<i>Ppd-D1</i>	Ppd-D1	KASP	F: 5'-ACGCCTCCCACTACACTG-3' R2: 5'-CACTGGTGGTAGCTGAGATT-3' R1: 5'-GTTGGTTCAAACAGAGAGC-3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов: 94°C – 20 сек, 55°C – 1 мин 37°C – 1 мин считывание сигнала	—	Beales et al., 2007
<i>TaPARG-2A</i>	cPARG-2A	KASP	A: 5' – CCTGGTGACGCCACGGTA – 3' B: 5' – CCTGGTGACGCCACGGTG – 3' C: 5' – GCAAGTCCATCGACACGTTC – 3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов: 94°C – 20 сек, 55°C – 1 мин 37°C – 1 мин считывание сигнала	—	Разработан в работе

Ген	Название маркера	Тип маркера (KASP/ПЦР)	Праймеры (5'→3')	Состав ПЦР-смеси (на 1 реакцию)	Программа амплификации	Размер продукта, п.н.	Литературный источник
<i>TaNLP3-3B</i>	NLP3-3B	KASP	A: 5' – CTAGTCCTCTTGAATATGGATATCAA – 3' B: 5' – CTAGTCCTCTTGAATATGGATATCAG – 3' C: 5' – ACATTTTGTGTCATTTAAGCCC – 3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов: 94°C – 20 сек, 55°C – 1 мин 37°C – 1 мин считывание сигнала	—	Разработан в работе
<i>TaGRF9-6B</i>	GRF9-6B-1155	KASP	A: 5' – GATCTCGATACCCATGACGTCT – 3' B: 5' – GATCTCGATACCCATGACGTCC – 3' C: 5' – CTGCCGGCCTAGTACATTTTCG – 3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов: 94°C – 20 сек, 55°C – 1 мин 37°C – 1 мин считывание сигнала	—	Разработан в работе
<i>TaGRF9-6A</i>	GRF9-6A-12del	ПЦР	F: 5' – CCGAGACATCGCTTTTCATATTTGG – 3' R: 5' – ACTATGTGCTTGCTTCTTGTGTC – 3'	70 mM Tris-HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM каждого dNTP, 30 mM праймеров, 0,05 ед/мкл Taq-	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C – 30 сек, 58°C – 30 сек, 72°C – 30 сек 72°C – 10 мин	191/203	Разработан в работе

Ген	Название маркера	Тип маркера (KASP/ПЦР)	Праймеры (5'→3')	Состав ПЦР-смеси (на 1 реакцию)	Программа амплификации	Размер продукта, п.н.	Литературный источник
				полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы			
<i>TaBT2-3A</i>	BT2-3A	ПЦР	F: 5' – GGTCTGGTTGGTGGAACCTG– 3' R: 5' – CCCATCACCAAATTAGATACTCG–3'	70 mM Tris–HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM каждого dNTP, 30 mM праймеров, 0,05 ед/мкл Taq-полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C – 30 сек, 60°C – 30 сек 72°C – 30 сек ————— 72°C – 10 мин	273/333	Разработан в работе
<i>TaGS2-2A</i>	pGS-2A	ПЦР	F: 5' – GGCCTCCGCTCCCATAAATATAA– 3' R: 5' – AACGCAACAGAGATTGAAGAAGC–3'	70 mM Tris–HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM каждого dNTP, 30 mM праймеров, 0,05 ед/мкл Taq-полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C – 30 сек, 60°C – 30 сек 72°C – 30 сек ————— 72°C – 10 мин	172/182	Разработан в работе
<i>TaNGR5-1B</i>	pNGR5-1B	KASP	A: 5' – GCAACATTAACACGGATGTAGCC– 3' B: 5' – GCAACATTAACACGGATGTAGCA–3' C: 5' – AGGTGTACTGCGCTGCATAT– 3'	2X KASP Master Mix – 5 мкл KASP Assay Mix – 0,14 мкл ДНК-матрица – 5 мкл	94°C – 15 мин, 94°C – 20 сек, 9 циклов -0,6°C за цикл: 60°C – 1 мин 35 циклов:	—	Разработан в работе

Ген	Название маркера	Тип маркера (KASP/ПЦР)	Праймеры (5'→3')	Состав ПЦР-смеси (на 1 реакцию)	Программа амплификации	Размер продукта, п.н.	Литературный источник
					94°C – 20 сек, 55°C – 1 мин ----- 37°C – 1 мин считывание сигнала		
<i>TaAMT-2B</i>	pAMT-2B	ПЦР	F: 5' – CATCACCATCTCTAGAGGCAACA– 3' R: 5' – TATCGTGTGGTGACGATGGTTTT–3'	70 mM Tris–HCl (pH 9,3), 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM каждого dNTP, 30 mM праймеров, 0,05 ед/мкл Taq-полимеразы, 5 нг/мкл ДНК-матрицы	94°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C – 30 сек, 60°C – 30 сек 72°C – 30 сек ----- 72°C – 10 мин	340/500	Разработан в работе