

Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне

О.П. Митрофанова , А.Г. Хакимова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

В обзоре приведены сведения о генетических исследованиях содержания белка в зерне у разных видов *Triticum* L. и *Aegilops* L. Рассмотрены закономерности географической изменчивости этого важного селекционного признака и результаты многолетней оценки по нему образцов коллекции ВИР. На основе этих оценок сформирована стержневая коллекция высокобелковых генетических источников. В нее включены диплоидные виды эгилопс – доноры геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидных пшениц и образцы ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшеницы. В 1970–1980-е гг. использование высокобелковых источников в селекции США и Канады привело к увеличению содержания белка в зерне мягкой пшеницы на 0,5–3,0 %, однако дальнейшего целенаправленного его повышения с помощью традиционных методов селекции достичь не удалось. Прорыв в увеличении содержания суммарного белка в зерне наметился с развитием методов молекулярной генетики и разработки молекулярных маркеров. Впервые у *T. dicoccoides* был идентифицирован функциональный локус, или ген *Gpc-B1* (хромосома 6BS), влияющий на накопление белка, цинка и железа в зерне, который клонирован и детально изучен. С использованием молекулярных маркеров активный аллель этого гена был обнаружен у некоторых местных и старых селекционных сортов *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta* и *T. aestivum*. Более того, у мягкой пшеницы были выявлены гены *Gpc-A1*, *Gpc-D1* и *Gpc-2* на хромосомах 6A, 6D и второй гомеологичной группы соответственно. Все эти гены были идентифицированы как NAC-факторы транскрипции, играющие важную роль в ускоренном старении растений и ремобилизации питательных веществ из листьев в зерно. Гены, родственные *Gpc-B1* *T. dicoccoides*, обнаружены в *G* геноме *T. timopheevii* и в *B (=S)* геноме у различных видов *Aegilops* sect. *sitopsis*. Функциональные аллели *Gpc-B1* введены в коммерческие сорта тетра- и гексаплоидной пшеницы, и как результат, в разных странах мира созданы новые высокобелковые и высокоурожайные сорта и серии почти изогенных линий, перспективные для научных исследований и селекции пшеницы.

Ключевые слова: генетические ресурсы; *Triticum*; *Aegilops*; содержание белка в зерне; гены *GPC*; NAC-факторы транскрипции; старение; ремобилизация; молекулярные маркеры; селекция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):545-554. DOI 10.18699/VJ16.177

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mitrofanova O.P., Khakimova A.G. New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):545-554. DOI 10.18699/VJ16.177

УДК 581.154:547.96:633.111:633.112:633.113
Поступила в редакцию 22.04.2016 г.
Принята к публикации 15.06.2016 г.
© АВТОРЫ, 2016

 e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content

O.P. Mitrofanova , A.G. Khakimova

N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

The present review offers an overview of genetic research on grain protein content (GPC) in various *Triticum* L. and *Aegilops* L. species. Regularities in geographic variability of GPC and the results of a long-term screening of accessions from the VIR collection for this trait are considered. On the basis of these assessments, a core-collection of genetic sources with high GPC has been formed. It includes the diploid *Aegilops* species as donors of *B*, *G* and *D* genomes for allopolyploid wheats, as well as accessions of di-, tetra- and hexaploid wheat species. The use of high-protein sources in wheat breeding in the United States and Canada in the 1970's–1980's resulted in the bread wheat GPC increase by 0.5–3.0 %; however, further purposeful attempts at increasing GPC by traditional breeding methods failed. A breakthrough in increasing the total GPC has been achieved as a result of molecular genetics methods and molecular markers development. For the first time, a functional locus, or the *Gpc-B1* gene (chromosome 6BS) affecting the accumulation of protein, Zn and Fe in grain, was identified in *T. dicoccoides*, cloned and studied in detail. The application of molecular markers has revealed the active allele of this gene in some landraces and old cultivars of *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta* and *T. aestivum*. Moreover, *Gpc-A1*, *Gpc-D1*, and *Gpc-2* wheat genes have been found in chromosomes 6A, 6D and homeologous group 2, respectively. All these genes have been identified as NAC transcription factors, which play an important role in the accelerated senescence of plants and remobilization of nutrients from leaves to grain. The genes related to *Gpc-B1* from *T. dicoccoides* were found in the *G* genome of *T. timopheevii* and *B (=S)* genome of different species of *Aegilops* sect. *sitopsis*. Functional *Gpc-B1* alleles have been introduced into commercial tetra- and hexaploid wheat cultivars, and it resulted in the creation of new high-protein and high-yield cultivars and series of nearly isogenic lines in different countries. They are promising sources for research and wheat breeding purposes.

Key words: genetic resources; *Triticum*; *Aegilops*; grain protein content; *GPC*-genes; NAC transcription factor; senescence; remobilization; molecular markers; breeding.

Содержание суммарного белка (Grain protein content, GPC) и состав индивидуальных белков – важные составляющие качества зерна пшеницы. От них зависят пищевая ценность и технологические достоинства зерна, а также качество вырабатываемых из него круп и муки. Для хлебопечения, изготовления макарон, лапши, кондитерских изделий или для кормопроизводства требуется зерно с различными технологическими и товарными характеристиками, в том числе с разным уровнем содержания белка.

В бывшем СССР были достигнуты выдающиеся успехи по созданию высокоурожайных сортов сильной и ценной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и улучшению качества зерна твердой пшеницы *T. durum* Desf. Один из факторов, способствующих этим успехам, – вовлечение в селекцию охарактеризованного по различным признакам мирового разнообразия пшениц сорта из коллекции Всесоюзного института растениеводства (ныне ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», ВИР). Создание высокоурожайных и высококачественных сортов остается приоритетной задачей и для современной селекции пшеницы.

Основная цель данного обзора – рассмотреть в историческом аспекте формирование генетических ресурсов пшеницы для использования в селекции на увеличение содержания суммарного белка в зерне; охарактеризовать недавно выявленные *Gpc*-гены, которые открывают новые возможности для работы с этим признаком, и показать достигнутые успехи по введению функциональных аллелей *Gpc-B1* в различные сорта.

Формирование в составе коллекции ВИР генофонда высокобелковых источников

В различных странах мира к началу XX в. многочисленными исследованиями был определен комплекс основных внешних и внутренних факторов, влияющих на накопление белка в зерне (Иванов, 1928–1929, 1947). Среди внешних факторов названы климат (температура, количество осадков) и плодородие почвы (содержание доступного азота для растения), при этом роль климата признана значительной, но не решающей, поскольку улучшением плодородия почвы можно было существенно нивелировать влияние естественных различий по климатическим условиям. Среди внутренних факторов приоритет отдан генотипу сорта, который контролирует процессы роста и развития растений пшеницы, поглощения и усвоения из окружающей среды химических элементов. Одну из лидирующих позиций в этих исследованиях занимал ВИР. Исследования были тесно связаны с проведением географических посевов и организованной в 1924 г. Н.И. Вавиловым сетью Государственного испытания новых и интродуцированных сортов мягкой и твердой пшеницы (Иванов, 1928–1929; Иванов, Княгиничев, 1936; Княгиничев, 1951). На основе многолетнего изучения сортов в различных почвенно-климатических условиях были составлены ориентировочные географические карты среднего содержания белка в зерне для каждого региона возделывания. Наиболее пригодными для получения высокобелкового (17–19 % и более) зерна мягкой

и твердой пшеницы оказались юго-восток европейской части РСФСР, степь Средней и Нижней Волги, Предкавказье, степь и южная лесостепь Западной Сибири, степная часть Украинской ССР, северная и южная части Казахской ССР (Иванов, 1947). Впервые было установлено, что при продвижении пшеницы с северо-запада на юго-восток увеличивается содержание белка, что, возможно, связано с увеличением дефицита осадков и доли почв, богатых азотом.

Обобщение и сравнительный анализ литературных сведений о среднем содержании белка в зерне пшеницы отдельных стран мира за период с 1920 по 1930 г. дали основание К.А. Фляксбергеру (1932) добавить к перечисленным выше регионам бывшего СССР степные и лесостепные районы Северной Америки, где также у пшеницы формируется высокобелковое зерно. Наиболее низкий процент белка в зерне был определен для сортов из стран с орошаемым земледелием (Вавилов, 1935).

Следующий пик активности исследований качества зерна пришелся на период с 1960 по 1980 гг. Основной акцент был сделан на поиск в коллекции пшеницы ВИР источников высокого содержания белка с наиболее сбалансированным составом по незаменимым аминокислотам, прежде всего лизину и триптофану (Конарев, 1975; 1980; Конарев, Чмелева, 1977). Вместе с мягкой и твердой пшеницей оценивали другие виды *Triticum* L. и различные виды *Aegilops* L. Выявлено довольно большое число генетических источников, стабильно воспроизводивших свои характеристики при выращивании в различных почвенно-климатических условиях (Покровская, 1967; Якубцинер, Покровская, 1969; 1971а, б; Покровская, Хорева, 1971; Тютюрев и др., 1973; Конарев и др., 1979). По мере выявления все эти источники условно объединяли в отдельный генофонд, стержневую коллекцию, высокобелковых пшениц. В ней представлены дикие, слабокультурные и возделываемые виды пшеницы и дикие виды эгилопс, предполагаемые доноры геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидных пшениц. Перечень видов, имеющих образцы с более высоким содержанием белка в зерне, чем у мягкой и твердой пшеницы, приведен в таблице, в которой также показаны пределы варьирования признака и его средняя величина. Паспортные данные высокобелковых образцов-источников можно найти в публикациях и каталогах ВИР. Обширная информация о мягкой пшенице с высоким содержанием белка в зерне также приводится в статье V.A. Johnson (1976).

В 1970–1980-х гг. в различных странах мира были разработаны селекционные программы по созданию высокобелковой пшеницы и проведены селекционно-генетические исследования внутривидовых гибридов, полученных с участием высокобелковых источников мягкой и твердой пшеницы. Наиболее интенсивное развитие эти исследования получили в США и Канаде, где количество белка в зерне сортов мягкой пшеницы было увеличено на 0,5–3,0 %. (Shewry, 2007). Было показано, что признак «содержание суммарного белка в зерне» – полигенный. На его проявление сильное влияние оказывают условия внешней среды, однако в гибридных расщепляющихся популяциях выявляются формы, уклоняющиеся в сторону высокобелкового родителя. Повысить у потомков этих

Характеристика видов *Aegilops* L. – доноров геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидной пшеницы и видов *Triticum* L. по содержанию суммарного белка в зерне*

Группы видов (число хромосом, геном)	Число изученных образцов	Белок в зерне, %	
		Лимиты	Средняя величина
Дикие виды			
<i>Ae. speltoides</i> ($2n = 2x = 14, BB$)	5	19,0–26,9	22,9
<i>Ae. tauschii</i> ($2n = 2x = 14, DD$)	22	17,3–23,0	19,9
<i>T. urartu</i> ($2n = 2x = 14, A^uA^u$)	1	23,1	
<i>T. boeoticum</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	11	23,0–30,6	26,9
<i>T. dicoccoides</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	10	18,3–30,6	25,2
<i>T. araraticum</i> ($2n = 4x = 28, GGA^bA^b$)	10	20,9–31,6	25,2
Слабоокультуренные виды пшеницы			
<i>T. sinskajae</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	1	21,5	
<i>T. monococcum</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	81	15,3–24,6	18,9
<i>T. dicoccum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	407	12,7–25,7	18,3
<i>T. ispahanicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	1	21,1	
<i>T. aethiopicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	8	17,1–25,6	20,2
<i>T. persicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	152	11,4–23,0	17
<i>T. polonicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	9	15,9–26,9	19
<i>T. turanicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	26	14,5–22,7	17,3
<i>T. turgidum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	7	15,1–20,0	16,7
<i>T. spelta</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	16	13,8–23,4	19,5
<i>T. vavilovii</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	2	17,2–20,9	19,1
<i>T. petropavlovskiyi</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	2	18,5–19,5	19
<i>T. timopheevii</i> ($2n = 4x = 28, GGA^bA^b$)	5	18,7–22,0	19,7
<i>T. timonovum</i> ($2n = 8x = 56, GGGGA^bA^bA^bA^b$)	1	24,9	
<i>T. zhukovskiyi</i> ($2n = 6x = 42, GGA^bA^bA^bA^b$)	1	23,6	
<i>T. fungicidum</i> ($2n = 8x = 56, GGBBA^uA^uA^bA^b$)	1	17,7	
Культурные виды пшеницы			
<i>T. durum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	398	12,1–21,4	16,2
<i>T. aestivum</i> , озимая ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	332	9,9–18,2	14,5
<i>T. aestivum</i> , яровая ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	140	12,3–18,3	15,7

*Обобщены данные из Каталогов мировой коллекции ВИР: 1972, Вып. 100; 1976, Вып. 182; 1977а, б, Вып. 203 и 215; 1983, Вып. 364; 1999, Вып. 698; 2003, Вып. 744.

форм содержание белка можно с помощью возвратных скрещиваний с ним (Дорофеев и др., 1972, 1987; Johnson et al., 1985). Между содержанием белка в зерне и урожайностью обнаружена отрицательная корреляция, которая усложняет селекцию на повышение обоих признаков одновременно. По этой причине, а также вследствие сложной полигенной природы признака и сильной его изменчивости под действием внешних факторов достичь дальнейшего существенного повышения содержания белка в зерне пшеницы не удалось. В настоящее время почти во всех хромосомах пшеницы обнаружено большое число главных и минорных локусов, влияющих на количество белка в зерне (Balyan et al., 2013; McIntosh et al., 2013). Локусы вовлечены в эпистатические взаимодействия

и не стабильны в своем фенотипическом проявлении. Многие из них рассмотрены в обзоре В.А. Крупнова и О.В. Крупновой (2012). Важно отметить, что до конца XX в. высокобелковые источники слабоокультуренных и диких видов пшеницы мало использовались в селекции на увеличение содержания белка, потенциал их генетического разнообразия не раскрыт.

Гены *Gpc-1* (*NAM-1*) и *Gpc-2* (*NAM-2*) *T. dicoccoides* (Koern. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., влияющие на содержание белка в зерне

Новые возможности для селекции на повышение суммарного белка в зерне появились в связи с выявлением у *T. dicoccoides* ($2n = 4x = 28$, геномная формула BBA^uA^u),

или дикой двузернянки, крупнозерных высокобелковых образцов (Avivi, 1978). Один из таких образцов, FA-15-3 (далее DIC), из Израиля, был включен в скрещивания с твердой пшеницей, сортом Langdon (далее LDN), для определения хромосом, влияющих на количество белка в зерне (Jorra, Cantrell, 1990; Cantrell, Jorra, 1991). Изучение дисомных линий сорта LDN с чужеродным замещением хромосом показало, что наиболее высокий процент белка был у линии LDN(DIC-6B), несущей пару хромосом 6B от DIC. С помощью рекомбинантных замещенных линий, полученных от скрещивания этой линии с реципиентным сортом LDN, был выявлен локус, влияющий на содержание белка. Он был обозначен как локус количественного признака *QGpc.ndsu-6Bb* и картирован в коротком плече 6B хромосомы, вблизи центромеры, между маркерными локусами *Xabg387-6B* и *Xmwg79-6B* (Jorra et al., 1997). Позднее этот локус успешно был передан в яровую мягкую пшеницу (Mesfin et al., 1999).

Для выяснения функции *QGpc.ndsu-6Bb* и уточнения границ его местоположения в пределах переданного хромосомного сегмента от DIC были использованы различные молекулярные маркеры и построены генетическая и физическая карты высокой плотности переданного сегмента. Кроме того, была определена микроколлинеарность между генами в этом сегменте и на участке короткого плеча хромосомы 2 *Oryza sativa* L., выявляемом теми же маркерами (Olmos et al., 2003; Distelfeld et al., 2004, 2006). Локус высокого содержания белка был определен как простой менделевский ген *Gpc-B1* примерно в центральной части сегмента, на участке размером в 2,7 сМ между маркерными локусами *Xcdo365* и *Xucw67*. Установлен высокий уровень коллинеарности между генами большей части (2,1 сМ) этого участка, фланкированного маркерными локусами *Xucw75* и *Xucw67*, и фрагмента в 350 т. п. н. короткого плеча хромосомы 2 риса. Показано, что один из маркерных локусов, а именно *Xuhw84*, координирует с геном *Gpc-B1*. Он ортологичен гену риса *OSJNBa002E05.19-1* и может быть геном-кандидатом для *Gpc-B1*.

При дальнейшем уточнении границ участка, в котором локализован *Gpc-B1*, была найдена последовательность размером 7,4 т. п. н., идентифицированная между маркерными локусами *Xuhw106* и *Xucw109* как ген, кодирующий NAC-доменный белок (Uauy et al., 2006b). NAC-белки, принадлежащие к одному из самых больших и специфичных для растений семейств NAC-факторов транскрипции, участвуют в регуляции различных программ развития растений, контроле защитных реакций на биотические и абиотические стрессоры, они играют важную роль в процессе старения растений (Olsen et al., 2005; Puranik et al., 2012; Rahaie et al., 2013; Podzimskas-Sroka et al., 2015). Первые члены этого семейства были выявлены и охарактеризованы у петунии (*Petunia*): NAM (Non-Apical Meristem) транскрипционный фактор, ответственный за образование апикальной меристемы побега, а также в растениях модельного объекта *Arabidopsis thaliana*: ATAF1 (Arabidopsis Transcription Activation Factor), ATAF2 и CUC2 (Cup-Shaped Cotyledon). Первые два белка у арабидопсиса участвуют в регуляции ответных реакций на механическое повреждение растений и небла-

гоприятные абиотические факторы, которые сопряжены с биосинтезом абсцизовой кислоты, последний из них определяет границу между семядолями при развитии зародышка. На основании выявленного сходства гена *Gpc-B1* с NAC-фактором транскрипции он был также обозначен как *NAC-B1 = NAM-B1 (DQ869673)*.

Определена нуклеотидная последовательность и установлена экзон-интронная структура функционального аллеля, или аллеля дикого типа гена *Gpc-B1*. Он содержит 1542 п. н. и включает три экзона и два интрона. Белок, рассчитанный для этой нуклеотидной последовательности, состоит из 405 аминокислотных остатков, имеет консервативный N-концевой участок, или NAC-домен с пятью субдоменами (A, B, C, D, E) в позициях аминокислот 34-55; 66-80; 88-124; 139-166 и 193-205 соответственно и сильно изменчивый C-концевой участок активации транскрипции TAR (Transcriptional Activation Region) (Uauy et al., 2006b; Dubcovsky et al., 2010). В его составе часто встречаются простые повторы аминокислот и повторяющиеся последовательности, богатые серином, треонином, пролином, глутамином или кислыми аминокислотами (Olsen et al., 2005). При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *Gpc-B1* у LDN и DIC было обнаружено, что в позиции 933 у LDN имеется вставка 1 п. н., приводящая к сдвигу рамки считывания. Рассчитанный для этого аллеля белок содержал 327 аминокислотных остатков и был неактивным (Uauy et al., 2006b).

Чтобы понять, каким образом функциональный аллель *Gpc-B1* увеличивает содержание белка, М.А. Kade с коллегами (2005) сравнили почти изогенные рекомбинантные замещенные линии, несущие активные или неактивные аллели *Gpc-B1*, с реципиентным сортом LDN по содержанию растворимого белка и аминокислот во флаговых листьях и концентрации суммарного азота в колосьях, зерне и стеблях. На основании полученных данных было сделано заключение, что линия, содержащая функциональные аллели *Gpc-B1*, накапливает больше белка в результате эффективной ремобилизации азота из листьев в колосья во время налива зерна. Значительные различия между некоторыми рекомбинантными замещенными линиями твердой пшеницы наблюдали также по скорости их старения, проявляющегося в пожелтении стебля и флаговых листьев, и снижении во флаговых листьях содержания хлорофилла (Uauy et al., 2006a). Эти различия были полностью сопряжены с наличием *Gpc-B1* от DIC, а точнее – участка размером 250 т. п. н. (0,3 сМ), фланкированного маркерными локусами *Xuhw89* и *Xucw71*.

Известно, что старение – это запрограммированная деградация компонентов клетки, делающая доступными питательные вещества для ремобилизации в развивающиеся семена. Возможно, *Gpc-B1* участвует в контроле этого процесса и обладает широким плейотропным эффектом (Distelfeld et al., 2007). В зерне рекомбинантных инбредных линий, несущих аллели от DIC, в сравнении с линиями, содержащими аллели от LDN, была обнаружена более высокая концентрация не только белка (в среднем на 38 %), но и цинка (12 %), железа (18 %) и марганца (29 %).

В дополнение к гену *Gpc-B1* мягкая пшеница имеет также активные гомеологичные гены *Gpc-A1* и *Gpc-D1*

на хромосомах 6A и 6D, которые участвуют в регуляции тех же процессов, что и *Gpc-B1* (Uauy et al., 2006b; Avni et al., 2014). У *Gpc-A1* идентифицировано пять аллелей, причем активный аллель *Gpc-A1a* выявлен преимущественно у яровой мягкой пшеницы из Непала, Китая и Японии, а неактивные *Gpc-A1b* и *Gpc-A1d* – у одного местного сорта из Грузии и в современных сортах Европы соответственно (Cormier et al., 2015). Более того, на хромосомах второй гомеологичной группы обнаружены паралогичные гены *Gpc-2* (*NAM-2*) (Uauy et al., 2006b). Они имеются и у твердой пшеницы (Distelfeld et al., 2012). На уровне ДНК сходство между генами *Gpc-1* и *Gpc-2* составляет 91 %, что указывает на относительно недавнюю дупликацию *Gpc-2* (Dubcovsky et al., 2010; Pearce et al., 2014).

Для изучения суммарного эффекта генов *Gpc* использовали метод интерференции РНК, или подавления (*silencing*) экспрессии генов. Для этого на основе сорта мягкой пшеницы Bobwhite, содержащего функциональные аллели генов *Gpc-A1* (хромосома 6A), *Gpc-D1* (6D), *Gpc-B2* (2B), *Gpc-D2* (2D) и делецию гена *Gpc-B1* (6B), были получены трансгенные линии (Uauy et al., 2006b). С помощью ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и геном-специфичных праймеров у одной из трансгенных линий на четвертый–девятый день после цветения наблюдали снижение в сравнении с контролем уровня транскрипции всех генов на 40–60 %, у другой трансгенной линии эффект был слабее. Одновременное подавление экспрессии всех *Gpc*-генов приводило к задержке старения растений более чем на три недели и сопровождалось снижением количества азота, цинка и железа в зерне. Изученные трансгенные линии подтверждали свои характеристики в течение двух поколений, что указывало на наследственную природу выявленных эффектов (Fu et al., 2007; Waters et al., 2009).

Поскольку гены *Gpc* относятся к NAC-факторам транскрипции, представляло интерес на этих же линиях определить, работу каких генов они регулируют. С использованием современных технологий секвенирования (Roche 454 pyrosequencing и Illumina systems) D. Cantu с коллегами (2011) на 12-й день после цветения провели транскриптомный анализ флаговых листьев у трансгенных линий сорта Bobwhite в сравнении с нетрансгенным контролем и показали, что процесс старения у растений пшеницы сопряжен с изменениями в экспрессии нескольких сотен генов. Среди них были гены-транспортёры, гены, участвующие в фотосинтезе, регулирующие метаболические процессы и ответные реакции на стрессоры, и др. Различия по уровню их экспрессии обнаруживали задолго до появления визуальных симптомов старения.

Для выяснения функции каждого из генов *Gpc* семена мягкой пшеницы сорта Express и твердой пшеницы Kronos были обработаны раствором 1 % этилметансульфоната, и с помощью метода Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) отобраны мутации, приводящие к образованию нефункционального белка (Avni et al., 2014; Pearce et al., 2014). У мягкой пшеницы их носителями стали одиночные мутанты *gpc-A1* и *gpc-D1*, а также двойной мутант *gpc-A1/gpc-D1*, у твердой пшеницы – одиночные мутанты *gpc-A1* и *gpc-B2* и двойной – *gpc-A1/gpc-B2*, у них было блокировано действие соответствующих генов. Мутанты имели почти идентичные профили экспрессии

во флаговых листьях на стадии колошения. Различия в наборах экспрессируемых генов начинали четко проявляться лишь на 12-й день после цветения. Доля генов, регулируемых *Gpc-A1*, была выше (64,2 %) доли генов, регулируемых *Gpc-B2* (37,1 %), причем каждый из этих генов участвовал в регуляции экспрессии разных наборов генов, связанных со старением. Выявлена группа локусов, экспрессия которых регулировалась комбинацией двух генов.

Таким образом, проведенные в мире исследования показали, что действие генов *Gpc*, влияющих на содержание белка в зерне, проявляется после цветения, на раннем этапе старения растения, и связано с ремобилизацией питательных веществ из вегетативных органов растения в зерно в процессе его налива.

Новые генетические источники высокого содержания белка в зерне

Благодаря разработке молекулярных маркеров, выявляющих функционально активные и/или неактивные аллели *Gpc-B1*, стали возможными генетический скрининг образцов коллекций и ускоренный отбор из гибридных популяций генотипов с определенным составом аллелей (Vishwakarma et al., 2014; Mishra et al., 2015). Для этих целей часто используют почти совершенный кодоминантный маркер *Xuhw89*, расположенный на расстоянии 0,1 сМ от *Gpc-B1* (Distelfeld et al., 2006), или маркеры, находящиеся от него на расстоянии 0,3–1,5 сМ, такие как *Xucw79*, *Xucw71*, *Xcdo365* и *Xucw67*, и другие маркеры (Khan et al., 2000; McIntosh et al., 2013; Wheat Applied Genomics. MASWheat Quality traits. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/HGPC/>).

С использованием молекулярных маркеров функциональный аллель *Gpc-B1* был обнаружен у 42 образцов *T. dicoccoides* и у 17 из 19 изученных образцов *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., или культурной полбы (Uauy et al., 2006a). Напротив, 57 сортов твердой пшеницы и 34 сорта мягкой пшеницы или содержали инсерцию 1 п. н., или имели делецию гена – частичную или полную, и как следствие, – неактивный продукт или его отсутствие.

Невыявление функциональных аллелей *Gpc-B1* у современных сортов могло быть связано с их потерей или в процессе доместикиции, или в современный период селекции. Для проверки, какое из двух предположений верное, L. Asplund с коллегами (2010) генотипировали 63 исторических сортообразца из музейной коллекции The Royal Swedish Academy of Forestry and Agriculture (Швеция). Большая часть этих образцов была представлена на Международной выставке в Лондоне в 1862 г. Для 32 образцов, происходящих из различных стран мира, удалось получить продукты амплификации. При их секвенировании было показано, что Галицийская (Galizian) яровая мягкая пшеница из Польши, сорт озимой пшеницы Marigold из Германии и два образца *T. spelta* L. из Центральной Европы имели функциональные аллели *Gpc-B1*. Таким образом, в XIX в. в генотипах некоторых гексаплоидных пшениц функциональные аллели *Gpc-B1* присутствовали.

В исследованиях J. Hagenblad с коллегами (2012) для поиска функциональных аллелей *Gpc-B1* использовали три набора образцов: (1) стержневую коллекцию гексапло-

идной пшеницы, созданную в INRA (Франция) и состоящую из 367 образцов, отобранных как репрезентативная выборка из 3942 образцов различного географического происхождения и охарактеризованных по аллельному разнообразию 38 полиморфных микросателлитных локусов (Balfourier et al., 2007); (2) выборку из 138 сортов яровой мягкой пшеницы преимущественно из скандинавских стран и Канады; (3) набор из 22 образцов *T. spelta*. В стержневой коллекции функциональные аллели *Gpc-B1* встречались с частотой 1 %, аллели с инсерциями в 1 п. н. – 28 %, и продукты амплификации не были выявлены в 66 % случаев. Небольшая часть стержневой коллекции была представлена гетерогенными образцами. В двух других изученных наборах функциональные аллели *Gpc-B1* встречались чаще: у *T. spelta* – 22,7 %, среди яровой мягкой пшеницы – 33,3 %. Из них семенной материал 28 сортов, созданных за период с 1890 по 1981 г., имеется в коллекции ВИР. В их число входят сорта Stanley к-22165 из Канады; Diamant к-25019 и Rubin к-38203 из Швеции; Ruskea к-25845, Sori к-33949 и Luja к-57198 из Финляндии; Noga к-43714 и Lanok к-53573 из Норвегии и др. (Asplund et al., 2013).

Таким образом, функциональные аллели гена *Gpc-B1* сохранились и в сортах, созданных в XX веке, но редко встречаются, если судить по результатам оценки исследованной к настоящему моменту выборки сортов. По-видимому, в современный период селекции пшеницы продолжается неконтролируемый процесс их утраты.

С целью поиска функциональных аллелей *Gpc* в *G* геноме *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ($2n = 4x = 28$, GGA^bA^b) были разработаны праймеры на основе известной полной нуклеотидной последовательности гена *DQ871219 T. dicoccoides*. С помощью этих праймеров у 12 образцов *T. timopheevii* из коллекций разных стран получены продукты амплификации, они клонированы и секвенированы (Hu et al., 2013). Показано, что все 12 нуклеотидных последовательностей имели одинаковую длину (1546 п. н.) и обладали типичными характеристиками генов NAC-семейства. Аминокислотная последовательность, рассчитанная для каждого из 12 *Gpc-G1* генов, включала 407 аминокислот, полипептиды имели сходство с белком гена *Gpc-B1 T. dicoccoides*. С использованием ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) было продемонстрировано, что уровни экспрессии 12 генов *Gpc-G1* различны и именно с ними наблюдается высокая положительная корреляция ($r = 0,957$, $p < 0,01$) содержания белка в зерне изученных образцов. Филогенетический анализ 12 генов *Gpc-G1* с 14 известными *NAM*-генами подтвердил их большее сходство с генами шестой гомеологичной группы хромосом, а не второй, которая контролирует высокое содержание белка в зерне ячменя *Hordeum vulgare* L.

По аналогичной схеме были изучены и охарактеризованы 11 аллелей *Gpc* у различных видов *Aegilops* L. sect. *sitopsis*: *Ae. speltoides* Tausch, *Ae. bicornis* (Forssk.) Jaub. & Spach, *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl., *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer, *Ae. sharonensis* Eig, предполагаемых доноров геномов *B* и *G* различных видов пшеницы (Hu et al., 2012). Полная длина нуклеотидных последовательностей этих аллелей с тремя экзонами и двумя интронами варьировала от 1540 до 1555 п. н. Они имели

высокую степень идентичности (96,28 %) между собой и высокую гомологию с *Gpc-B1* и *Gpc-G1*. Кодлируемые этими последовательностями белки обладали всеми признаками NAC-белка. По-видимому, эти гены выполняют такую же функцию, как и *Gpc-B1*. Построенное на основе сравнения полных нуклеотидных последовательностей генов филогенетическое дерево позволило продемонстрировать, что *B* и *G* геномы пшеницы имеют наиболее высокий уровень сходства с геномом *Ae. speltoides*.

Интрогрессия функциональных аллелей *Gpc-B1* в мягкую и твердую пшеницы

О возможности передачи генов высокого содержания белка не только от DIC, но и от других образцов дикой двузернянки сообщали (Klindworth et al., 2009; Aykut Tonk et al., 2010; Hussein et al., 2014).

Первыми гексаплоидными формами с яровым типом развития, в которые целенаправленно были введены функциональные аллели *Gpc-B1*, стали созданные в США сорт Glupro (ND-643) и селекционные линии ND-683 и ND-645, полученные от скрещивания с DIC (Mesfin et al., 1999). В дальнейшем с участием сорта Glupro получены новые сорта твердозерной озимой мягкой пшеницы – Farnum (к-65944) (<http://washingtoncrop.com/documents/Wheat/Winter/Hard%20Red/Farnum.pdf>), яровой мягкой пшеницы – Lassik, твердой пшеницы – Westmore и Desert King-High Protein (HP) (http://smallgrains.ucdavis.edu/cereal_files/WhtCVDesc_LJ11.pdf).

В Канаде посредством создания дигаплоидов и применения маркер-контролируемого отбора получено три коммерческих сорта яровой мягкой пшеницы. Из них Lillian (DePauw et al., 2004) и Somerset (Fox et al., 2005) относятся к товарному классу канадских западных яровых краснозерных сортов, а Burnside – к канадским западным сверхсильным сортам (Humphreys et al., 2009). Донором функциональных аллелей *Gpc-B1* для сорта Lillian служила линия 90B07-AU2B от скрещивания Pasqua*2/ND643. В сравнении с ней и линией ND643, ставшей впоследствии сортом Glupro, у Lillian участок хромосомы, интродуцированный от DIC, был меньше по размеру, но в нем также присутствовал ген *Yr36* устойчивости взрослых растений к желтой ржавчине, тесно сцепленный (0,3 cM) с функциональным аллелем *Gpc-B1* (DePauw et al., 2011; Hale et al., 2012; Randhawa et al., 2013). Созданные сорта или уступали, или незначительно превосходили, или не отличались по урожайности от сортов, у которых не являлся маркер гена *Gpc-B1*, но все они имели более высокий процент белка в зерне (от 13,4 до 16,1 %) и созревали на два–три дня раньше. Сорт Lillian также содержал блок сцепленных генов *Lr34/Yr18* (хромосома 7D) устойчивости к бурой и желтой ржавчине, имел выполненный стебель и был устойчивым к пшеничному стеблевому пилильщику *Cephus cinctus* Nort., распространенному в Северной Америке.

С целью уточнения эффектов функциональных аллелей *Gpc-B1* на содержание белка в зерне в разных генетических средах, определения их влияния на другие признаки и факторов внешней среды на их проявление в разных странах мира были созданы и изучены серии почти изогенных линий на основе мягкой и твердой пшеницы.

В США для введения функциональных аллелей *Gpc-B1* использовали сорта и линии мягкой пшеницы Anza, Yesoga Rojo, Attila, UC1037, UC1041, а также твердой пшеницы – Kofa, Kronos, UC1113, причем у Yesoga Rojo и UC1113, как и у Lilian, введенный функциональный аллель *Gpc-B1* был тесно сцеплен с геном *Yr36* (Brevis, Dubcovsky, 2010). Созданные почти изогенные и сестринские им линии BC₆F₃ были протестированы в трех пунктах в течение трех лет. Все линии с функциональными аллелями *Gpc-B1* имели больше белка в зерне и меньше азота в стеблях, при этом у них была ниже масса 1000 зерен, но по урожайности они не различались. Кроме того, у линий мягкой пшеницы с функциональными аллелями *Gpc-B1* увеличивались водопоглотительная способность муки, время замеса теста и объем хлеба; у линий твердой пшеницы улучшались качество клейковины и реологические свойства семялины, твердость спагетти и уменьшались потери сухого вещества при варке (Brevis et al., 2010).

Неоднозначные результаты были получены при оценке почти изогенных линий BC₅F₅ сортов яровой мягкой пшеницы Tara 2002 и Scarlet, адаптированных к условиям регионов с большим количеством осадков или с полупустынным климатом соответственно (Carter et al., 2012). В сравнении с родительскими сортами ускоренное старение было выявлено только в один год для линий Tara 2002, несущих функциональные аллели *Gpc-B1*, а также для таких линий обоих сортов в теплице, при оптимальных условиях роста и развития растений. Однако эти различия не повлияли на содержание белка в зерне. В другой год у тех же линий Tara 2002 наблюдали увеличение содержания белка на 0,5 %, при этом видимых симптомов старения не было обнаружено. В течение двух лет у всех линий с функциональными аллелями *Gpc-B1* отмечали уменьшение массы 1000 зерен, но ни по урожайности, ни по накоплению Mg, Cu и Zn, ни по содержанию азота и углерода в соломе и зерне линии не различались. Не выявив ожидаемого эффекта функциональных аллелей *Gpc-B1*, авторы связали этот факт с коротким периодом вегетации растений в регионе. Влияние разной продолжительности вегетации на проявление гена *Gpc-B1* требует дальнейшего изучения.

В Аргентине результаты проведенных исследований на почти изогенных линиях сортов яровой мягкой пшеницы ProINTA Grana и ProINTA Oasis дали основание заключить, что интрогрессия функциональных аллелей *Gpc-B1* – ценный ресурс для улучшения содержания белка в зерне (Tabbata et al., 2013).

В Индии были получены гомозиготные линии BC₃F₅/F₆ поколений с функциональными аллелями *Gpc-B1* на основе 10 сортов и линий мягкой пшеницы (Kumar et al., 2011). Донором аллелей была американская линия Yesoga Rojo. У 71 из созданных линий обнаружен высокий процент белка в зерне в трех пунктах выращивания без потери урожайности, но статистически значимого увеличения содержания белка в сравнении с рецессивными родительскими формами не показано. Лишь семь линий превосходили (содержание белка от 14,8 до 17,9 %) родительские формы в одном из трех пунктов выращивания или по объединенным данным и не снижали урожайность, высоту растений, продуктивную кустистость, число зерен

на колос, массу 1000 зерен. Успешным также оказалось объединение в одном генотипе функциональных аллелей *Gpc-B1* с эффективными генами *Lr24* и *Lr28*, контролирующими устойчивость к бурой ржавчине.

В Австралии были получены почти изогенные линии на основе полукарликовых сортов Wyalkatchem и Gladius и линии VR1128, адаптированных к средиземноморскому типу климата, характерному для южного и западного регионов пшеничного пояса Австралии (Eagles et al., 2014). Донорами функциональных аллелей *Gpc-B1* были канадские сорта Somerset и Burnside, которые также несут тесно сцепленные гены *Lr34/Yr18* устойчивости к бурой и желтой ржавчине. Оценка линий в поле в 13 различных пунктах в течение 2009–2011 гг. показала, что присутствие в генотипах линий функциональных аллелей *Gpc-B1* приводило к увеличению содержания белка в зерне и уменьшению массы 1000 зерен почти во всех пунктах изучения. При этом отдельные линии были вполне сопоставимыми с элитным сортом Mace по урожайности. Они незначительно, в сторону увеличения, отличались от него по массе 1000 зерен, не различались по датам колошения, а также обладали приемлемой натурной массой зерна. По мнению Н.А. Eagles с коллегами (2014), введение функциональных аллелей *Gpc-B1* в новые сорта может служить механизмом для частичного ослабления существующей отрицательной корреляции между урожайностью и содержанием белка.

Известно, что реакция на жару как стрессор проявляется в укорочении периода развития зерновки, ускорении старения верхнего междоузлия, снижении урожайности и изменении показателей качества клейковины. Особенно чувствителен к жаре синтез крахмала, что объясняет влияние стрессора на размер зерна и концентрацию в нем белка. Австралийские ученые провели опыты по выяснению действия высокой температуры на налив зерна у линий, несущих функциональные аллели *Gpc-B1* (Maphosa et al., 2014). Для этого использовали сорта Gladius, Drysdale, Wyalkatchem, Burnside, Somerset, Glupro и селекционную линию RAC1262A (отбор из линии RAC1262, которая впоследствии стала Gladius). Опыт проведен при большом числе повторностей в теплице в контролируемых условиях (24/18 °C, 14/10 ч день/ночь), через три дня после цветения половину растений каждого сорта и линии помещали в камеру (37/27 °C, 14/10 ч день/ночь) на 15 дней. Как показали результаты опыта, действие высокой температуры не оказало существенного влияния на фенотипическое проявление функциональных аллелей *Gpc-B1*.

Итак, к настоящему времени в мире сформировались и опробованы новые генетические ресурсы, с использованием которых показана возможность повышения содержания суммарного белка в зерне пшеницы без снижения урожайности, ухудшения качества и других хозяйственно ценных признаков. К этим ресурсам можно отнести:

- выявленные у разных видов пшеницы и эгилопса гены *Gpc-1* и *Gpc-2*, влияющие на накопление белка, цинка и железа в зерне, относящиеся к NAC-факторам транскрипции и участвующие в регуляции работы других генов;
- созданные в разных странах мира коммерческие сорта, разного типа генетические линии, мутанты, трансген-

ные растения, представляющие собой новый исходный материал для научных исследований и селекции;
– молекулярные маркеры, разработанные для идентификации функциональных и неактивных аллелей *Gpc*-генов, которые можно применять для генотипирования отдельных гибридных растений, линий, сортов, образцов разных видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* и мониторинга передачи аллелей *Gpc* от донора к реципиенту.
Большой интерес для генотипирования с использованием молекулярных маркеров представляет сформированная в ВИР «стержневая» коллекция высокобелковых генетических источников. У них могут быть выявлены не только новые аллели генов *Gpc*, но и другие новые гены, ценные для селекции пшеницы.

Благодарности

В конце 2015 г. исполнилось 100 лет со дня рождения академика Василия Григорьевича Конарева. Эту статью мы посвящаем памяти нашего учителя. Созданная им в ВИРе научная школа внесла большой вклад в изучение генома клеточного ядра растений, познание природы белков семян и разработку принципов и методов белковых маркеров для геномного и генетического анализа растений, а также в решение проблем повышения качества зерна.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935.
Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчаннинова О.Д., Шитова И.П., Мережко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л.: ВО «Агропромиздат». Ленингр. отд-ние, 1987.
Дорофеев В.Ф., Якубцинер М.М., Семенова Л.В., Руденко М.И., Новикова М.В., Степанова Г.И., Охотникова Т.В., Шитова И.П. Высококачественные пшеницы. Каталог. Л., 1972;86.
Иванов Н.Н. Химический состав пшениц СССР. Результаты географических опытов 1923–1926. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1928-1929;XXI(4):47-320.
Иванов Н.Н. Проблема белка в растениеводстве. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1947:21-30.
Иванов Н.Н., Княгиничев М.И. Биохимия пшеницы. Биохимия культурных растений. М.; Л.: Сельхозгиз, 1936;5-86.
Каталог образцов мировой коллекции ВИР с характеристикой содержания белка и аминокислот. Л., 1972;100.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеницы с высоким и повышенным содержанием белка в зерне. Л., 1976;182.
Каталог мировой коллекции ВИР. Твердая пшеница (новейшие поступления с характеристикой технологических свойств зерна). Л., 1977a;203.
Каталог мировой коллекции ВИР. Высокобелковые пшеницы. Л., 1977b;215.
Каталог мировой коллекции ВИР. Виды рода *Triticum L.* (Характеристика образцов по содержанию белка и лизина в зерне). Л., 1983;364.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеница. Комплексная оценка перспективных по качеству зерна образцов яровой мягкой пшеницы в условиях Центрально-Черноземного района России. Санкт-Петербург, 1999;698.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеница. Технологические и агробиологические характеристики образцов яровой мягкой пшеницы в условиях различных регионов России. Санкт-Петербург, 2003;744.

Княгиничев М.И. Биохимия пшеницы. Л.: Сельхозгиз, 1951.
Конарев В.Г. Молекулярно-генетические аспекты оценки исходного материала на белок. Тр. по прикл. ботан., генет., селекции. 1975;54(1):163-172.
Конарев В.Г. Белки пшеницы. М.: Колос, 1980:193-214.
Конарев В.Г., Чмелева З.В. Характеристика мировых ресурсов пшеницы по содержанию в зерне белка и лизина и фонд высокобелковых пшениц. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1977;59(3):31-38.
Конарев В.Г., Чмелева З.В., Мойса И.И. Состав, структура и свойства клейковины разного происхождения. Бюлл. ВИР. 1979;92:69-75.
Крупнов В.А., Крупнова О.В. Генетическая архитектура содержания белка в зерне пшеницы. Генетика. 2012;48(2):140-159.
Покровская Н.Ф. Количественный и качественный состав белка и крахмала мягких пшениц в зависимости от районов выращивания. Вестн. с.-х. науки. 1967;6:37-44.
Покровская Н.Ф., Хорева В.И. Содержание лизина и триптофана в зерне пшениц разной ploidy. Докл. ВАСХНИЛ. 1971;11:8-11.
Тютюрев С.Л., Чмелева З.В., Мойса И.И., Дорофеев В.Ф. Изучение содержания белка и незаменимых аминокислот в зерне видов пшеницы и их диких сородичей. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1973;1:222-241.
Флякбергер К. Белок в зерне пшениц земного шара. Социалистическое растениеводство. 1932;1:15-31.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна тетраплоидных пшениц. С.-х. биология. 1969;IV(3):348-357.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна гексаплоидных пшениц. С.-х. биология. 1971a;VI(1):22-28.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна диплоидных пшениц. С.-х. биология. 1971b;VI(5):669-675.
Asplund L., Bergkvist G., Leino M.W., Westerbergh A., Weih M. Swedish spring wheat varieties with the rare high grain protein allele of *NAM-B1* differ in leaf senescence and grain mineral content. PLoS ONE. 2013;8(3):e59704. DOI 10.1371/journal.pone.0059704.
Asplund L., Hagenblad J., Leino M.W. Re-evaluating the history of the wheat domestication gene *NAM-B1* using historical plant material. J. Archaeol. Sci. 2010;37:2303-2307. DOI 10.1016/j.jas.2010.04.003.
Avivi L. High protein content in wild tetraploid *Triticum dicoccoides* Korn. Proc. 5th Intern. Wheat Genetic Symp. Ed. S. Ramanujam. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, New Delhi, India. 1978:372-380.
Avni R., Zhao R., Pearce S., Jun Y., Uauy C., Tabbita F., Fahima T., Slade A., Dubcovsky J., Distelfeld A. Functional characterization of *GPC-1* genes in hexaploid wheat. Planta. 2014;239:313-324. DOI 10.1007/s00425-013-1977-y.
Aykut Tonk F., Lker E., Tosun M. A study to incorporate high protein content from tetraploid wheat (*T. turgidum dicoccoides*) to hexaploid wheat (*T. aestivum vulgare*). Turk. J. Field Crops. 2010;15(1):69-72.
Balfourier F., Roussel V., Strelchenko P., Exbrayat-Vinson F., Sourdille P., Boutet G., Koenig J., Ravel C., Mitrofanova O., Beckert M., Charmet G. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. Theor. Appl. Genet. 2007;114:1265-1275. DOI 10.1007/s00122-007-0517-1.
Balyan H.S., Gupta P.K., Kumar S., Dhariwal R., Jaiswal V., Tyagi S., Agarwal P., Gahlaut V., Kumari S. Genetic improvement of grain protein and other health-related constituents of wheat grain. Plant Breeding. 2013. available at <http://wileyonlinelibrary.com>. DOI 10.1111/pbr.12047.
Brevis J.C., Dubcovsky J. Effects of the chromosome region including the *Gpc-B1* locus on wheat grain and protein yield. Crop Sci. 2010;50:93-104. DOI 10.2135/cropsci2009.02.0057.
Brevis J.C., Morris C.F., Manthey F., Dubcovsky J. Effect of the grain protein content locus *Gpc-B1* on bread and pasta quality. J. Cereal Sci. 2010;51:357-365. DOI 10.1016/j.jcs.2010.02.004.

- Cantrell R.G., Joppa L.R. Genetic analysis of quantitative traits in wild emmer (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Crop Sci.* 1991;31(3):645-649.
- Cantu D., Pearce S.P., Distelfeld A., Christiansen M.W., Uauy C., Akhunov E., Fahima T., Dubcovsky J. Effect of the down-regulation of the high *Grain Protein Content* (*GPC*) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. *BMC Genomics.* 2011;12:492-509. DOI 10.1186/1471-2164-12-492.
- Carter A.H., Santra D.K., Kidwell K.K. Assessment of the effects of the *Gpc-B1* allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest region of the USA. *Plant Breeding.* 2012; 131:62-68. DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01900.x.
- Cormier F., Throude M., Ravel C., Le Gouis J., Leveugle M., Lafarge S., Exbrayat F., Duranton N., Praud S. Detection of NAM-A1 natural variants in bread wheat reveals differences in haplotype distribution between a worldwide core collection and European elite germplasm. *Agronomy.* 2015;5:143-151. DOI 10.3390/agronomy5020143.
- DePauw R.M., Knox R.E., Humphreys D.G., Thomas J.B., Fox S.L., Brown P.D., Singh A.K., Prozniak C., Randhawa H.S., Fowler D.B., Graf R.J., Hucl P. New breeding tools impact Canadian commercial farmer fields. *Czech. J. Genet. Plant.* 2011;47:28-34.
- DePauw R.M., Townley-Smith T.F., Humphreys G., Knox R.E., Clarke F.R., Clarke J.M. Lillian hard red spring wheat. 2004. available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Lillian.pdf>.
- Distelfeld A., Cakmak I., Peleg Z., Ozturk L., Yazici A.M., Budak H., Saranga Y., Fahima T. Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiol. Plantarum.* 2007;129:635-643. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00841.x.
- Distelfeld A., Pearce S.P., Avni R., Scherer B., Uauy C., Piston F., Slade A., Zhao R., Dubcovsky J. Divergent functions of orthologous NAC transcription factors in wheat and rice. *Plant Mol. Biol.* 2012; 78:515-524. DOI 10.1007/s11103-012-9881-6.
- Distelfeld A., Uauy C., Fahima T., Dubcovsky J. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol.* 2006;169:753-763. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01627.x.
- Distelfeld A., Uauy C., Olmos S., Schlatter A.R., Dubcovsky J., Fahima T. Microcolinearity between a 2-cM region encompassing the grain protein content locus *Gpc-6B1* on wheat chromosome 6B and f 350-kb region on rice chromosome 2. *Funct. Integr. Genomics.* 2004;4:59-66. DOI 10.1007/s10142-003-0097-3.
- Dubcovsky J., Fahima T., Uauy C., Distelfeld A. NAC from wheat for increasing grain protein content. United States Patent No.: US 7820882B2. Oct. 26, 2010. available at <https://books.google.com.tr/patents/US7820882>.
- Eagles H.A., McLean R.B., Eastwood R.F., Appelbee M.-J., Cane K., Martin P.J., Wallwork H. High-yielding lines of wheat carrying *Gpc-B1* adapted to Mediterranean-type environments of the south and west of Australia. *Crop Pasture Sci.* 2014;65(9):854-861. <http://dx.doi.org/10.1071/cp14106>.
- Fox S.L., Townley-Smith T.F., Humphreys D.G., McCallum B.D., Fetch T.G., Gaudet D.A., Gilbert J.A., Menzies J.G., Noll J.S., Howes N.K. Somerset hard red spring wheat. 2005. available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Somerset.pdf>.
- Fu D., Uauy C., Blechl A., Dubcovsky J. RNA interference for wheat functional gene analysis. *Transgenic Res.* 2007;16:689-701. DOI 10.1007/s11248-007-9150-7.
- Hagenblad J., Aspland L., Balfourier F., Ravel C., Leino M.W. Strong presence of the high grain protein content allele NAM-B1 in Fennoscandian wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:1677-1686. DOI 10.1007/s00122-012-1943-2.
- Hale I., Zhang X., Fu D., Dubcovsky J. Registration of wheat lines carrying the partial stripe rust resistance gene *Yr36* without the *Gpc-B1* allele for high grain protein content. *J. Plant Regist.* 2012;7(1): 108-112.
- Hu X.-G., Wu B.-H., Liu D.-C., Wei Y.-M., Gao S.-B., Zheng Y.-L. Variation and their relationship of *NAM-G1* gene and grain protein content in *Triticum timopheevii* Zhuk. *J. Plant Physiol.* 2013;170: 330-337. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.009>.
- Hu X.-G., Wu B.-H., Yan Z.-H., Dai S.-F., Zhang L.-Q., Liu D.-C., Zheng Y.-L. Characteristics and polymorphism of NAM gene from *Aegilops* section *sitopsis* species. *Afr. J. Agric. Res.* 2012;7(37): 5252-5258. DOI 10.5897/AJAR12.078.
- Humphreys D.G., Townley-Smith T.F., Lukow O., McCallum B., Gaudet D., Gilbert J., Fetch T., Menzies J., Brown D., Czarniecki E. Burnside extra strong hard red spring wheat. 2009. Available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Burnside.pdf>.
- Hussein H.A., Ebtissam H.A.H., El-Sayed O.E., Al-Ansary A.M.F., Khatib S.A., Sally A.A.R. Inter specific crosses and marker assisted selection for improving the nutritional value of Egyptian wheat cultivars. *Int. J. Agric. Res.* 2014;9(3):119-135. DOI 10.3923/ijar.2014.113.135.
- Johnson V.A. Wheat Protein. *Basic Life Sci.* 1976; Mar 1-7;8:371-385.
- Johnson V.A., Mattern P.J., Peterson C.J., Kuhr S.L. Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetic techniques. *Cereal Chem.* 1985;62(5):350-355.
- Joppa L.R., Cantrell R.G. Chromosomal location of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat. *Crop Sci.* 1990;30:1059-1064. DOI 10.2135/cropsci1990.0011183X003000050021x.
- Joppa L.R., Du C., Hart G.E., Hareland G.A. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci.* 1997;37:1586-1589. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700050030x.
- Kade M.A., Barneix J., Olmos S., Dubcovsky J. Nitrogen uptake and remobilization in tetraploid Langdon durum wheat and a recombinant substitution line with the high grain protein gene *Gpc-B1*. *Plant Breeding.* 2005;124:343-349. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01110.x.
- Khan I.A., Procinier J.D., Humphreys D.G., Tranquilli G., Schlatter A.R., Marcucci-Poltri S., Froberg R., Dubcovsky J. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* transferred to bread wheat. *Crop Sci.* 2000;40:518-524.
- Klindworth D.L., Hareland G.A., Elias E.M., Faris J.D., Chao S., Xu S.S. Agronomic and quality characteristics of two new sets of Langdon durum-wild emmer wheat chromosome substitution lines. *J. Cereal Sci.* 2009;50:29-35. DOI 10.1016/j.jcs.2009.02.003.
- Kumar J., Jaiswal V., Kumar A., Kumar N., Mir R.R., Kumar S., Dhariwal R., Tyagi S., Khandelwal M., Prabhu K.V., Prasad R., Balyan H.S., Gupta P.K. Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars. *Field Crop. Res.* 2011;123:226-233. DOI 10.1016/j.fcr.2011.05.013.
- Maphosa L., Collins N.C., Taylor J., Mather D.E. Post-anthesis heat and *Gpc-B1* introgression have similar but non-additive effects in bread wheat. *Funct. Plant Biol.* 2014;41:1002-1008. <http://dx.doi.org/10.1071/FP14060>.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th Intern. Wheat Genetics Symp. 8-13 September 2013;Yokohama, Japan. available at <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.
- Mesfin A., Froberg R., Anderson J.A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat. *Crop Sci.* 1999;39(2): 508-513.
- Mishra V.K., Gupta P.K., Arun B., Chand R., Vasistha N.K., Vishwakarma M.K., Yadav P.S., Joshi A.K. Introgression of a gene for high grain protein content (*Gpc-B1*) into two leading cultivars of wheat in Eastern Gangetic Plains of India through marker assisted back-cross breeding. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2015;7(8):292-300. DOI 10.5897/JPBCS2015.0514.
- Olmos S., Distelfeld A., Chicaiza O., Schlatter A.R., Fahima T., Echenique V., Dubcovsky J. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107: 1243-1251. DOI 10.1007/s00122-003-1377-y.

- Olsen A.D., Ernst H.A., Leggio L.L., Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 2005;10(2):79-87. DOI 10.1016/j.tplants.2004.12.010.
- Pearce S., Tabbita F., Cantu D., Buffalo V., Avni R., Vazques-Gross H., Zhao R., Conley C.J., Distelfeld A., Dubcovsky J. Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. *Plant Biol.* 2014;14:368-391. DOI 10.1186/s12870-014-0368-2.
- Podzimska-Sroka D., O'Shea C., Gragersen P.L., Skriver K. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops. *Planta.* 2015;4:412-448. DOI 10.3390/plants4030412.
- Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S., Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2012;17(6):369-381. DOI 10.1016/j.tplants.2012.02.004.
- Rahaie M., Xue G-P., Schenk P.M. The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. 2013; <http://dx.doi.org/10.5772/54795>.
- Randhawa H.S., Asif M., Pozniak C., Clarke J.M., Graf R.J., Fox S.L., Humphreys C., Knox R.E., DePauw R.M., Singh A.K., Cuthbert R.D., Hucl P., Spaner D. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. *Plant Breeding.* 2013;132:458-471. DOI 10.1111/pbr.12057.
- Shewry P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* 2007;46:239-250. DOI 10.1016/j.jcs.2007.06.006.
- Tabbita F., Lewis S., Vouilloz J.P., Ortega M.A., Kade M., Abbate P.E., Barneix A.J. Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breeding.* 2013;132:48-52. DOI 10.1111/pbr.12011.
- Uauy C., Brevis J.C., Dubcovsky J. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.* 2006a;57(11):2785-2794. DOI 10.1093/jxb/erl047.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubkovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zink, and iron content in wheat. *Science.* 2006b;314:1298-1301.
- Vishwakarma M.K., Mishra V.K., Gupta P.K., Yadav P.S., Kumar H., Joshi A.K. Introgression of the high grain protein gene *Gpc-B1* in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding. *Curr. Plant Biol.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpb.2014.09.003>.
- Waters B.M., Uauy C., Dubcovsky J., Grusak A. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zink, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 2009;60(15):4263-4274. DOI 10.1093/jxb/erp257.
- Wheat Applied Genomics. MASWheat Quality traits. High grain protein content. Available at <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/HGPC/index.htm>.