

*На правах рукописи*



КРУЧИНИНА ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АРХИТЕКТониКИ  
КОЛОСА ПШЕНИЦ И ЕГО КОМПЬЮТЕРНОЕ  
ФЕНОТИПИРОВАНИЕ**

1.5.7 – Генетика (биологические науки)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2024

Работа выполнена в секторе генетики пшениц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)» (г. Новосибирск).

**Научный руководитель:**

**Гончаров Николай Петрович** – д.б.н., академик РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики скороспелости пшениц ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)», (г. Новосибирск).

**Официальные оппоненты:**

1. **Агафонов Александр Викторович** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН)», (г. Новосибирск).
2. **Евтушенко Елена Васильевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)», (г. Новосибирск).

**Ведущая организация** - ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), (г. Москва).

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН по адресу: 630090 г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10. Тел/факс: (383)3634906; Факс: (383)3331278, e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.icgbio.ru](http://www.icgbio.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность темы исследования

Одно из важнейших направлений современной генетики возделываемых растений, в том числе и пшеницы (род *Triticum* L.), – всестороннее генетическое и филогенетическое изучение, расширение и эффективное использование их биоразнообразия и вовлечение в него пула генов дикорастущих видов-сородичей. Согласно результатам новейших исследований, генетическое разнообразие важных для сельского хозяйства растений несёт наибольшие потери на этапе их введения в культуру (Дзюбенко, 2001; Yadav, 2023). Следовательно, рациональное сохранение генного пула таких видов является очень важными трендом. Именно поэтому, исследования, посвящённые определению аутентичности образцов и видов пшениц для сохранения и последующего эффективного использования в генетике, ботанике и селекции, становятся исключительно актуальными (Дзюбенко, 2012).

Для создания естественных классификаций таких видов, необходимо в полной мере провести описание всех существующих мелких и крупных таксонов (Синская, 1969) и свести информацию о них в общедоступные цифровые коллекции. Применение такого подхода полезно как для экспериментальной работы, так и для селекции и апробации сортообразцов и генофондов сельскохозяйственных растений. Знание о материале, с которым работает исследователь, а также сведения о том, как подробно его необходимо изучать определяет эффективность и успех дальнейшей работы. В настоящий момент у значительной части сельскохозяйственных растений, в том числе и пшениц (см., например, обзор Feldman, Levy, 2023), однозначно не определены объёмы видов и родов. При изучении систематики таких растений особенно чётко проявляется проблема укрупнения-дробления таксонов (Goncharov, 2011). Именно поэтому принципиально важно, чтобы естественная классификация каждого конкретного рода сельскохозяйственно значимых растений, к которым относится и пшеница, отражала бы их видовую и внутривидовую структуру (Дорофеев, 1985), которую необходимо не только корректно описывать, но и эффективно использовать в исследованиях и практической работе.

У видов пшениц таксономически значимыми в подавляющем большинстве являются признаки морфологии колоса, определяющие его архитектуру (Дорофеев, 1985). Оценка колоса пшениц в современных исследованиях выполняется экспертом на основе визуального анализа и требует существенных затрат времени, при том, что в таких экспериментах проводится анализ тысяч растений (Afonnikov et al., 2016). Поэтому автоматизация этого процесса является актуальной для ботаники, генетики и селекции. Реализация технологий анализа цифровых изображений, создание баз данных для организации хранения информации и её последующего анализа при помощи алгоритмов машинного

обучения в совокупности, позволит повысить эффективность фенотипирования колосьев (Li et al., 2016; Komyshev et al., 2017).

Достоинство цифровых коллекций заключается в том, что для обработки объёмных массивов данных, которые содержатся в базах данных (информация о произрастании, морфологии и др.) не требуется больших материальных затрат. Особенно актуальной является оцифровка труднодоступных коллекций с редким растительным материалом и материалом с удалённых территорий. Свободный доступ к оцифрованным коллекциям (базам данных) позволит актуализировать знания о таксономии, систематике растений и определить аутентичность хранящихся в них образцов.

#### **Цель исследования:**

Провести всестороннее изучение таксономически значимых (классификационных) признаков, определяющих архитектуру колоса, у ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшениц, изучить их фенотипическое проявление и наследование, и создать на основе полученных данных всеобъемлющую цифровую коллекцию типовых колосьев видов пшениц всех уровней ploидности рода *Triticum* L. для их автоматизированного определения (классификации).

#### **Задачи:**

1. Выявить таксономически значимые морфологические признаки, определяющие архитектуру колоса (спельтоидность, компактность, тетраостость, полоникумность, ветвистоколосость, округлозёрность) на трёх уровнях ploидности пшениц, охарактеризовать их количественно и оценить возможность их использования для автоматизированного определения видов и их эффективного верифицирования;
2. Оценить вклад видоспецифических признаков растений пшеницы в фенотипическое проявление морфологии колоса и определить характер их наследования у растений пшеницы, определить их генетический контроль с целью получения устойчивых классификаций и их использования для автоматического разделения видов;
3. Создать цифровую коллекцию по морфологии колоса, отражающую полиморфизм видов пшениц всех уровней ploидности;
4. На основании выбранных базисных признаков аннотировать цифровую коллекцию колосьев видов пшениц, оценить её информативность и осуществить её тестирование посредством разделения цифровых изображений по группам ploидности пшениц.

## Научная новизна результатов

Изучен полиморфизм и наследование видоспецифических признаков одновременно на всех уровнях ploидности пшениц у конкретных видов:

- гексаploидных - *T. aestivum* L., *T. compactum* Host, *T. antiquorum* Heer ex Udacz., *T. spelta* L., *T. petropavlovskiyi* Udacz. et Migusch., *T. yunnanense* King ex S.L. Chen, *T. macha* Dek. et Men., *T. sphaerococcum* Perciv., *T. vavilovii* Jakubz. – спельтоидность, компактность, округлозёрность, ветвистоколосость;
- тетраploидных - *T. durum* Desf., *T. dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., *T. aethiopicum* Jakubz., *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk., *T. polonicum* L., *T. turgidum* L., *T. dicoccum* Schrank ex Schuebl., *T. militinae* (Zhuk. et Migusch.) Valdes & H. Scholz, *T. carthlicum* Nevski – спельтоидность, тетраостость, полоникумность, ветвистоколосость;
- и диплоидных - *T. monococcum* L., *T. urartu* Thum. ex Gandil., *T. boeoticum* Boiss., *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. – спельтоидность,

и установлены базисные, для автоматического разделения с использованием нейронных сетей, признаки (индексы округлости и закруглённости, периметр колоса без остей, длина ломанной линии вдоль оси колоса, площадь остей и др.).

Впервые создана цифровая коллекция колосьев видов пшениц всех уровней ploидности, не имеющая аналогов в мире, проведено её аннотирование. С помощью, созданной цифровой коллекции с использованием биоинформатических методов и нейронных сетей показана возможность эффективного разделения образцов пшениц по уровням ploидности и секциям рода *Triticum* L.

## Теоретическая и практическая значимость

Анализ наследования видоспецифических (таксономически значимых) морфологических признаков колоса у растений разных видов пшеницы позволит определить наиболее значимые классификационные признаки на всех уровнях ploидности рода *Triticum* L. и предложить их использование для автоматического разделения видов.

С использованием созданной цифровой коллекции видов пшениц показана возможность с применением биоинформатических методов, нейронных сетей и машинного обучения, автоматизированного установления видов пшеницы, что является необходимым для высокопроизводительного фенотипирования.

Сведения о наследовании и проявлении морфометрических характеристик колоса могут быть использованы в селекционной работе и генетических

исследованиях, при проведении интрогрессированной гибридизации в роде *Triticum* L.

Свободный доступ к оцифрованным коллекциям позволит актуализировать знания о таксономии, систематике растений и определить аутентичность хранящихся в них образцов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Таксономически значимые признаки, определяющие архитектуру колоса пшениц – спельтоидность, компактность, округлозёрность, ветвистоколосость, тетраостость и полоникумность, наследуются у гексаплоидных и тетраплоидных видов по моногенному типу и могут быть использованы как реперные для определения видовой принадлежности пшениц.
2. Количественные параметры признаков, описывающих у пшениц форму и параметры колоса (округлость и закруглённость, периметр колоса без остей, длина ломаной линии вдоль оси колоса) и площадь остей, являются видоспецифическими и могут быть использованы для автоматического разделения пшениц по уровню ploидности.
3. Создана цифровая коллекция колосьев пшениц, отражающая изменчивость в роде *Triticum* L. по архитектуре колоса, являющаяся основой цифрового классификатора, использование которого позволяет с высокой вероятностью проводить фенотипирование растений пшениц по уровню ploидности и видовой принадлежности.

### **Апробация результатов**

Материалы, положенные в основу диссертации, были представлены и обсуждены на 12-й Международной мультikonференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии – BGRS/SB» (Новосибирск, 2020), на V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2022), на VII Международной научной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений (PlantGen 2023)» (Казань, 2023), на 7-й Международной конференции, посвящённой 95-летию академика РАН П.Л. Гончарова «Генофонд и селекция растений»(GPB 2024) (Новосибирск, 2024).

### **Публикации**

Основные результаты работы представлены в семи научных статьях, три из которых опубликованы в зарубежных журналах категории Q1, входящих в

международных баз цитирования (WoS, Scopus), а также в пяти тезисах международных и российских научных конференций.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, разделы, описывающие материалы и методы исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 154 страницах, содержит 24 рисунка и 25 таблиц. Список цитируемой литературы включает 136 источников литературы.

### **Личный вклад автора**

Автором лично выполнены все экспериментальные исследования, получение цифровых изображений и статистическая обработка данных по проверке гипотез наследования признаков, а также созданию, аннотированию и тестированию ЦК колосьев пшеницы. Проведение молекулярных исследований выполнено совместно с к.б.н. А.Г. Блиновым и к.б.н. В.Ю. Вавиловой. Биоинформатическая обработка результатов выполнена совместно с д.б.н. Д.А. Афонниковым, к.б.н. Е.Г. Комышевым и к.б.н. М.А. Генаевым. Обработка цифровых изображений выполнена совместно с к.б.н. В.С. Ковалем.

### **Благодарности**

Автор выражает особую благодарность научному руководителю д.б.н., академику Гончарову Николаю Петровичу, коллективам сектора генетики пшениц, тепличного комплекса и селекционно-генетического комплексов ИЦиГ СО РАН за доступ к оборудованию и помощь по уходу за растительным материалом.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Растительный материал**

Объектом исследования послужила пшеница разного уровня ploidy из коллекции сектора генетики пшеницы ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск):

- Диплоидные виды пшеницы ( $2n = 2x = 14$ ) - *T. monococcum* (18 образцов), *T. urartu* (10 обр.), *T. boeoticum* (7 обр.), *T. sinskajae* (1 обр.);
- Тетраплоидные виды пшеницы ( $2n = 4x = 28$ ) - *T. dicoccoides* (18 обр.), *T. durum* (24 обр.), *T. aethiopicum* (29 обр.), *T. dicoccum* (19 обр.), *T. timopheevii* (21 обр.), *T. carthlicum* (20 обр.), *T. polonicum* (18 обр.), *T. turgidum* (14 обр.), *T. turanicum* (1 обр.), *T. araraticum* (1 обр.), *T. militinae* (1 обр.);
- Гексаплоидные виды пшеницы ( $2n = 6x = 42$ ) - *T. aestivum* (11 обр.), *T. antiquorum* (2 обр.), *T. compactum* (3 обр.), *T. petropavlovskiyi* (8 обр.), *T.*

*yunnanense* (5 обр.), *T. spelta* (4 обр.), *T. macha* (8 обр.), *T. vavilovii* (4 обр.), *T. sphaerococcum* (2 обр.), *T. tibetanum* (1 обр.), *T. timococcum* (1 обр.), *T. kiharae* (1 обр.), *T. dimococcum* (1 обр.), *T. zhukovskyi* (1 обр.);

- Октаплоидные виды пшеницы ( $2n = 8x = 56$ ) - *T. soveticum* (1 обр.), *T. flaksbergeri* (1 обр.);
- Декаплоидные виды пшеницы ( $2n = 10x = 70$ ) - *T. borisovii* (1 обр.).

Эксперименты проведены в яровом посеве, в парниках селекционно-генетического комплекса (СГК) и в гидропонной теплице Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск в 2019-2024 гг.

### Методы исследования

**Гибридологический анализ.** Применялся с целью выявления стабильно проявляющихся видоспецифических признаков. Ввиду того, что большинство этих признаков контролируется по моногенному типу и имеет чёткое фенотипическое проявление, гибридологический анализ являлся незаменимым и основным видом анализа для проведения детальной классификации. При его проведении изучали расщепление в  $F_2$  гибридов.

**Метод фенотипирования архитектоники колоса.** Колосья фотографировали согласно 2 протоколам (протокол «на столе» и протокол «на прищепке»). В область каждого кадра помещается цветовая шкала ColorChecker, позволяющая произвести цветовую коррекцию изображения. Учитывая совокупность разных протоколов съёмки и проекций колоса, за каждым растением фиксировалось до пяти фотографий его колоса. После фотографирования растений образцов пшеницы, полученные фотографии помещали в базу данных, где они дополнительно обрабатывались программами анализа изображений.

**Оценка количественных характеристик колосьев.** На основе анализа изображений, а также при помощи программы WERecognizer была произведена комплексная оценка количественных характеристик параметров колосьев. Для определения прогноза индекса плотности колоса были использованы наиболее информативные признаки модели, а также общие признаки формы и остей (Awns area, Circularity, Roundness, Perimeter, Rachis length,  $x_{u2}$ ,  $x_{b2}$ ,  $y_{u2}$ ,  $y_{bm}$ ). Для ординации изображений колосьев был применён нелинейный алгоритм снижения размерности - метод t-SNE. Данный метод позволяет оценить распределение колосьев в пространстве анализируемых признаков. Изображение каждой проекции одного колоса расценивалось как отдельный объект.

**Оценка качественных характеристик колосьев.** Оценка ряда качественных характеристик колоса поддаётся визуальной оценке и не требует использования каких-либо дополнительных методов. Были изучены следующие признаки: форма колоса, ветвистоколосьность, остистость/безостость, тетраостость, спельтоидность, полоникумность, компактность.

**Статистический анализ.** Соответствие характера расщепления теоретически ожидаемому, анализировалось с помощью метода Пирсона хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы Excel, версия: 14.0.7128.5000 (32-разрядная). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимался равным 0.05.

**Выделение ДНК, ПЦР-амплификация и клонирование генов ломкоколосости *Btr-1*.** Мини-набор DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США) был использован для выделения общей ДНК из 100 мг листьев. Были разработаны геном-специфичные праймеры для амплификации генов *Btr1-A* и *Btr1-B/Btr1-S*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Фенотипирование архитектуры формы колоса

Задачей первого этапа настоящего исследования являлось выявление таксономически значимых морфологических признаков на трёх уровнях пloidности пшениц, их количественная характеристика и оценка возможности использования для автоматизированного определения видов. Для успешной реализации поставленной задачи возникла потребность в применении современных биоинформатических методов для корректной оценки морфометрии колоса пшеницы. На основании использования алгоритмов предполагалось осуществить распределение образцов пшеницы по признакам, провести фенотипирование видоспецифических признаков пшеницы, определяющих архитектуру колоса.

В результате проведенного исследования и использован стандартный алгоритм (рисунок 1), позволяющий предсказывать по форме колоса тип пloidности пшениц (Genaev et al., 2019).

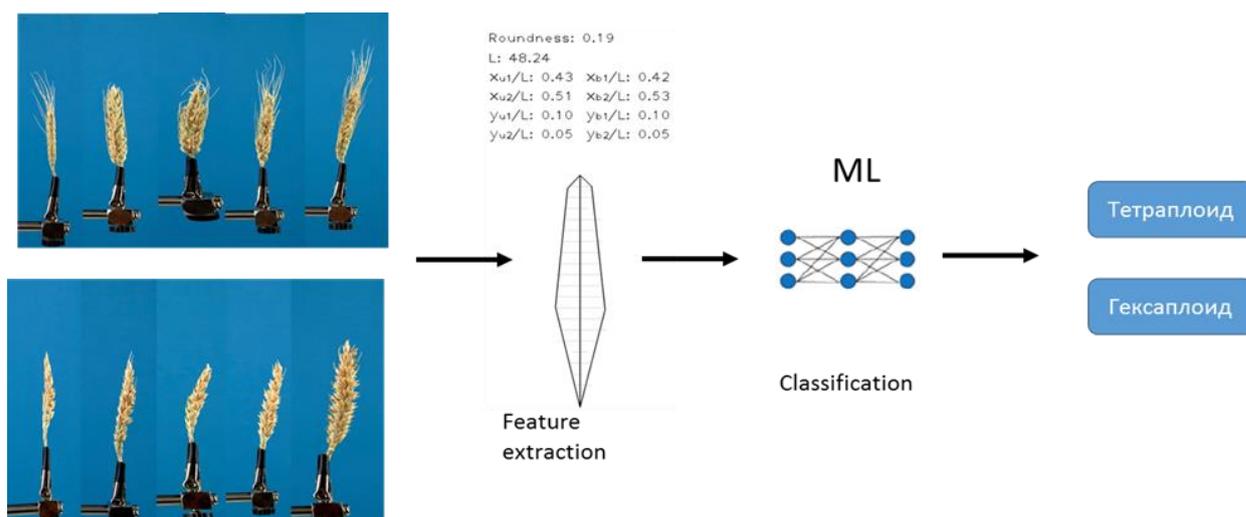


Рисунок 1. Используемый алгоритм для предсказания типов пloidности (Genaev et al., 2019). Примечание. Feature extraction – выделение признаков; ML – машинное обучение; Classification – классификация.

Изображения колосьев помещались в базу данных и обрабатывались по признакам. В ходе обработки применялась свёрточная нейронная сеть, которая решала задачу сегментации изображения на области, принадлежащие фону, колосу и остям.

Тетраплоидные виды пшеницы являются самой многочисленной группой в роде *Triticum* L. и в нашем исследовании. Наследование видоспецифических признаков у данных видов является плохо изученным и требует скрупулёзного детального изучения. Образцов гексаплоидных пшениц в роде меньше, по сравнению с тетраплоидными. Видоспецифические признаки гексаплоидной пшеницы изучены хорошо (Vavilova et al., 2022).

Суммируя изученный, в данной работе, материал по всем видам пшеницы, а также F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> гибридов, получаем: 401 образец = 4301 колос = 21505 фото.

С использованием метода t-SNE было осуществлено нелинейное отображение признаков колосьев из пространства 9 геометрических характеристик в двумерное пространство обобщённых параметров. Визуализация результатов этого анализа представлена на рисунках 2 и 3.

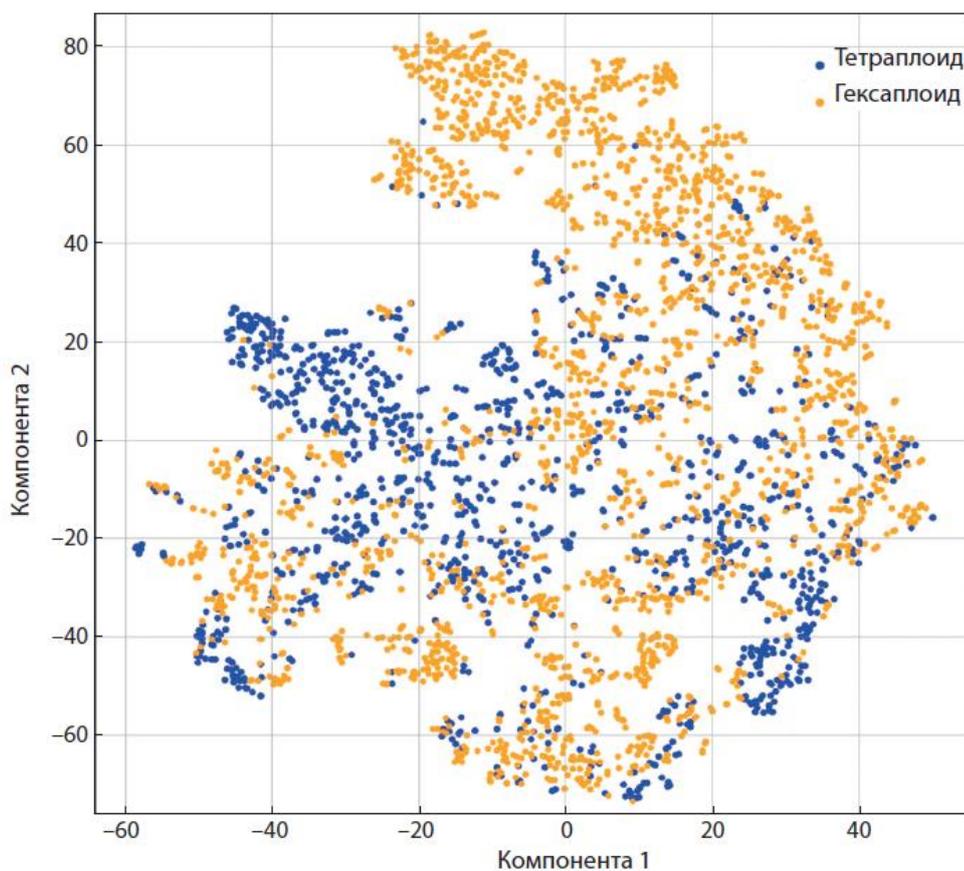


Рисунок 2. Ординация цифровых изображений колосьев ряда генотипов при помощи метода t-SNE. Примечание: тетраплоидные виды пшеницы – синий цвет, гексаплоидные – оранжевый.

На рисунке 2 каждая точка представляет собой одно из проанализированных изображений колосьев. Точки окрашены двумя цветами в соответствии с плоидностью растений, а именно, синий - тетраплоидные виды, оранжевый – гексаплоидные. На рисунке 3 каждому изображению колоса соответствует точка, форма и окраска которой определены в соответствии с принадлежностью растения к определённому виду. Метод t-SNE обеспечил визуализацию процесса распределения изображений колосьев при анализе тетраплоидных видов пшениц по признакам «площадь остей», «длина колоса», «периметра тела колоса».

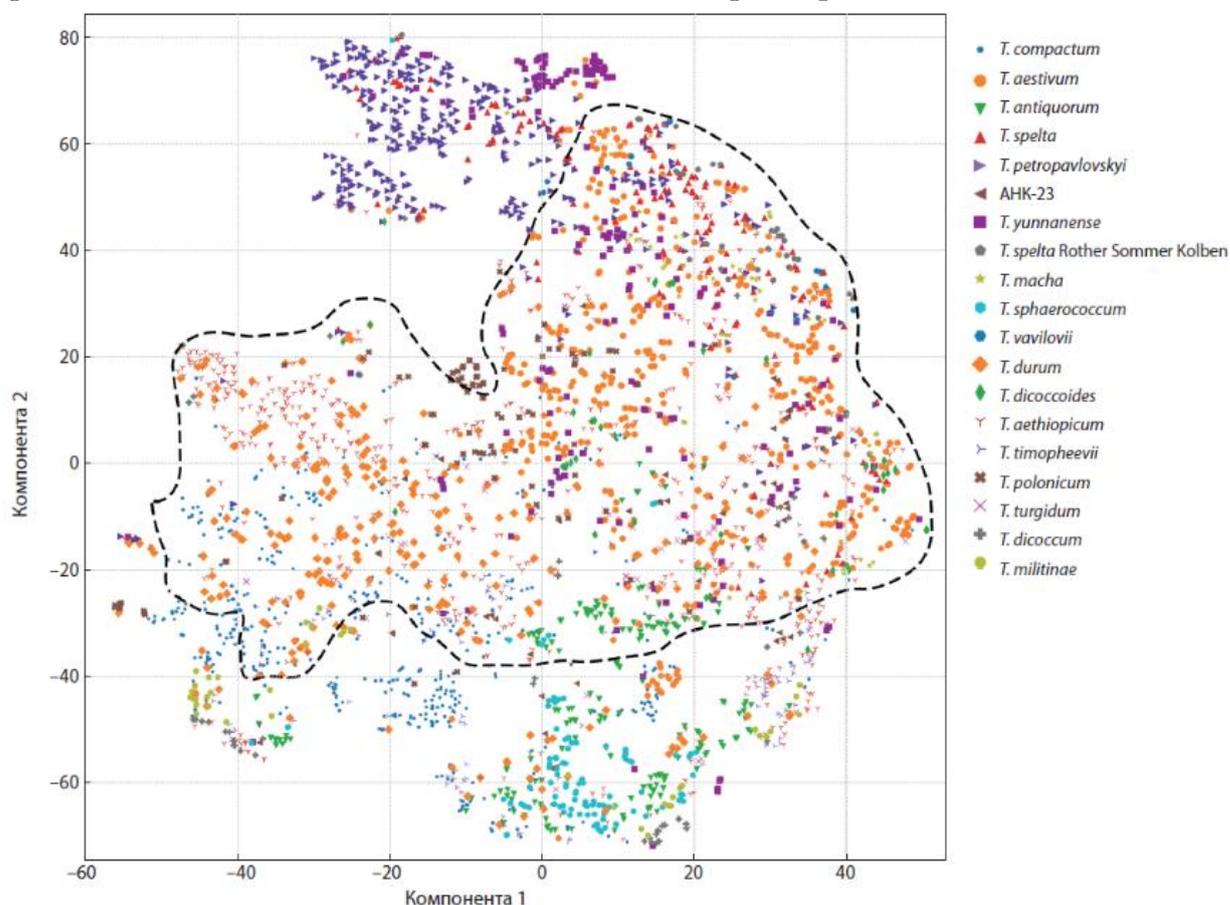


Рисунок 3. Ординация цифровых изображений колосьев ряда генотипов при помощи метода t-SNE, полученная на основании количественных признаков. Примечание: цвет и форма каждой точки соответствуют определенному виду. Штриховой линией отмечена область, занимаемая видами *T. aestivum* и *T. durum*.

Следует отметить, что представленные на рисунках 2 и 3 диаграммы, дают возможность продемонстрировать разнообразие колосьев пшениц по различным характеристикам как между уровнями плоидности, так и между видами.

С использованием данных методов произведено фенотипирование видоспецифических признаков пшеницы по всем вегетациям. Среди всего многообразия признаков, которыми характеризуются растения пшеницы, в цифровую коллекцию колосьев видов пшениц были введены лишь некоторые из них, являющиеся видообразующими и таксономически значимыми, а именно:

спельтоидность, компактность, округлозёрность, ветвистоколосость, а также у ряда видов наличие/отсутствие остей.

### Изучение наследования видоспецифических признаков у тетраплоидных ( $2n = 4x = 28$ ) видов пшениц

Актуальность изучения наследования видоспецифических признаков у тетраплоидных видов пшениц определяется недостаточностью информации по данному вопросу и значимостью ее для создания цифровой коллекции колосьев видов пшениц. На данном этапе исследования предполагалось проведение гибридологического анализа и изучение в  $F_1$  и  $F_2$  гибридов наследования видоспецифических признаков у *T. aethiopicum*, *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum*.

В таблице 1 представлен характер наследования в  $F_2$  гибридов комбинаций скрещивания, в которых материнской формой взят вид *T. aethiopicum*. По такому же принципу были проанализированы видоспецифические признаки в скрещиваниях, где в качестве материнских растений брали виды *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum*.

Помимо скрещиваний, в результате которых идёт расщепление по Менделю ( $\chi^2 = 3:1$ ), получены результаты, где моногенного расщепления (3:1) не выявлено, наследование ( $\chi^2 = 13:3$ , 15:1, 61:3, 63:1). Такие данные могут говорить о том, что, вероятно, в данных комбинациях скрещивания имеются гены, контролирующие самонесовместимость, в связи с чем результаты не соответствуют теоретически ожидаемым.

Таблица 1. Анализ наследования видоспецифических признаков, где в качестве материнского растения был взят вид *T. aethiopicum* (♀)

	Форма колоса (норм/спел)	Тип остей	Окраска колоса, Rg (есть/нет)	Остистость/безостистость	Длина кол. чешуи (норм/удл.)	Тетраостость (есть/нет)	Зубец (острый/тупой)	Опушение кол. чеш. (есть/нет)	Плешка (есть/нет)
♂ <i>T. dicoccum</i>	1.73*	2.22*	8.66	-	-	-	-	-	-
	5.36	-	1.55*	11.46					
♂ <i>T. dicoccoides</i>	0.96*	-	4.41	0.96*	8.30	-	-	-	-
♂ <i>T. polonicum</i>	-		0.21*	1.86*					
♂ <i>T. carthlicum</i>	-	0,05*	0,69^	-	-	2,55*	0,22#	14,92	10,13

Примечание. На пересечении видов и изученных признаков даётся числовое значение  $\chi^2 = 3:1$ .  $k=1$ , уровень значимости  $p < 0.05$  (3.81). \* -  $\chi^2 = 3:1$ ; ^ -  $\chi^2 = 13:3$ ; # -  $\chi^2 = 15:1$ ;

- доминантное проявление по материнскому типу  
 - рецессивное проявление по отцовскому типу

## Молекулярно-биологическое изучение ломкоколосости у тетра- ( $2n=28$ ) и гексаплоидных ( $2n=42$ ) видов пшениц

Молекулярно-биологические исследования показали, что ген *Vtr*, контролирующий ломкоколосость не представляется возможным использовать в процессе создания цифровой коллекции, в связи с тем, что он приводит к ломкости колоса, к её крайней выраженности, что затрудняет процесс аннотирования образцов пшеницы.

Также показано, что выявленный аллелизм по последовательностям *Q* гена не позволяет эффективно его использовать для разделения подвидов у гексаплоидных спельтоидных пшениц, т.к. он маскируется более сильным влиянием гена *Tg*.

### Создание цифровой коллекции видоспецифических признаков колосьев пшеницы

Итогом выполнения данной работы явилось создание цифровой коллекции видоспецифических признаков колосьев пшеницы. С одной стороны, это предполагало систематизацию и упорядочивание накопленных данных, с другой – обеспечивало возможность идентификации новых растений, что подчеркивает практическую значимость выполненной работы.

Информация по описанию и анализу морфологических признаков колосьев пшеницы, внесённая в цифровую коллекцию колосьев - позволила дополнить базу данных и применить методы биоинформатического анализа и компьютерного обучения. На данный момент на основании созданной нами цифровой коллекции колосьев расширена информация базы данных, которая включает 2 подколлекции:

1. Подколлекция  $F_2$  гибридов *T. aestivum* × *T. yunnanense* – 124 растения – 620 фото.
2. Подколлекция 7 гексаплоидных видов пшениц (*T. sphaerococcum*, *T. spelta*, *T. macha*, *T. compactum*, *T. antiquorum*, *T. aestivum*, *T. yunnanense*) и 1 амфиплоида (*Amphyploid speltiforme*) – 256 растений – 1280 фото.

Подколлекция  $F_2$  гибридов представляет интерес в связи с тем, что родительские образцы растений имеют разную по плотности форму колоса (*T. aestivum* – нормальный колос; *T. yunnanense* – плотный колос). Вторая подколлекция содержит виды пшеницы с контрастными формами колоса. Аннотирование колосьев осуществлялось по следующим морфологическим характеристикам:

- Форма колоса
- Длина колоса
- Количество колосков
- Индекс плотности колоса
- Цвет колоса
- Характер остистости
- Опушение колосковой чешуи
- Опушение на оси колоска

Расширенная база данных цифровой коллекции колосьев расположена на сайте ИЦиГ СО РАН по ссылке: <http://spikedroid.biores.cytogen.ru/en>.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам генетического анализа признаков пшениц для создания цифровой коллекции колосьев видов пшениц были использованы наиболее информативные из них, а именно: спельтоидная и компактная формы колоса, наличие круглого зерна, ветвистоколосость и наличие/отсутствие остей. Эти признаки являются основными таксономически значимыми признаками. По описанным выше признакам у тетраплоидных пшениц выявлен следующий генетический контроль: спельтоидность (ген *Q*), тетраостость (ген *ta*), полоникумность (ген *PI*), ветвистоколосость (ген *bh*). В то время как, видоспецифические признаки гексаплоидных пшениц были следующие: спельтоидность (ген *Q*), компактность (ген *C2*), округлозёрность (ген *s*), ветвистоколосость (ген *V*).

### Наследование видоспецифических признаков у *T. aethiopicum*

При скрещивании *T. aethiopicum* × *T. dicoccum* F<sub>2</sub> гибридов наследуют форму колоса по отцовскому типу, а тип остей по материнскому; окраска колоса достоверно наследуется гибридами по материнскому типу. При скрещивании *T. aethiopicum* × *T. dicoccoides* форма колоса и безостость наследуются по отцовскому типу, проявляя своё доминирование. В то время, как при использовании в качестве отцовского растения, вида *T. polonicum*, отсутствие окраски колоса и безостость, так же, достоверно наследуются по отцовскому типу.

При скрещивании с *T. carthlicum*, в качестве отцовского растения можно видеть, что характер наследования остей наследуется по отцовскому типу, а отсутствие тетраостости по материнскому, т.е. признак «тетраостость» наследуется по рецессивному типу.

### Наследование видоспецифических признаков у *T. durum*

При скрещивании *T. durum* × *T. dicoccum* среди всех F<sub>2</sub> гибридов форма колоса наследуется по материнскому типу, как и отсутствие опушения колосковой чешуи, характерное для вида *T. durum*. Исходя из 2 скрещиваний с такими родительскими формами получаем, что в 1-м скрещивании в F<sub>2</sub> гибридов наследуют от него форму колоса, опушение колосковой чешуи, а также тип остей, в то время как во 2-ом скрещивании наличие дополнительной ости, характерное для отцовского вида *T. dicoccum*, достоверно наследуется по материнскому типу (т.е. дополнительной ости нет).

В скрещиваниях, где в качестве отцовской формы был взят вид *T. dicoccoides* опушение колосковой чешуи наследуется моногенно по доминантному типу, а в скрещиваниях, где отцовской формой был вид *T. dicocum* таких результатов получено не было. Анализируя потомство в скрещивании *T. dicocum* × *T. durum*, опять же, признак опушения колосковой чешуи контролируется по рецессивному типу от материнской формы.

В следующем скрещивании, где в качестве отцовского растения взят вид *T. polonicum* по признаку длина колосковой чешуи мы получили значение  $\chi^2 = 0.061$ . В F<sub>2</sub> гибридов наследуется удлинённая колосковая чешуя по отцовскому типу. В скрещивании *T. durum* × *T. turgidum* признак «ветвистоколосость» наследуется по материнскому типу, т.е. не проявляется в F<sub>1</sub> гибридов.

### **Наследование видоспецифических признаков у *T. dicocum***

Если в качестве отцовского растения взять вид *T. carthlicum*, то все изученные признаки достоверно наследуются по отцовскому типу, а именно отсутствие опушения колосковой чешуи, тетраостость, отсутствие дополнительной ости и наличие окраски колоса. Наличие окраски колоса у вида *T. dicocum* контролируется доминантными генами, а в нашем исследовании материнская форма колоса была не окрашена, соответственно в F<sub>2</sub> гибридов преимущественно унаследовали чёрную окраску колоса по отцовскому типу, как и при скрещивании, где в качестве отцовского растения был взят вид *T. dicoccoides*, где в F<sub>2</sub> гибридов также унаследовали окраску по отцовскому типу.

Согласно Р.В. Рожкову (2014), с соавт. признак «персикоидность», или «тетраостость», наследуется моногенно по рецессивному типу. Однако согласно нашим данным, в F<sub>2</sub> гибридов с признаком тетраостости больше, нежели без этого признака. Соответственно, признак тетраостости контролируется по доминантному типу. Однако, анализируя данные, где произведено скрещивание тех же видов, но в этот раз в качестве материнской формы взят вид *T. carthlicum*, наблюдается обратный результат, а именно, что в F<sub>2</sub> гибридов с признаком тетраостости меньше, нежели без этого признака. В скрещивании *T. dicocum* × *T. carthlicum* опушение колосковой чешуи контролируется от отцовской формы по доминантному типу. Признак «ветвистоколосость», который анализировался здесь при скрещивании с *T. turgidum*, наследуется рецессивно, что согласуется с результатами А.С. Жангазиева (2011), и наследуется таким образом по материнскому типу, т.е. форма колоса нормальная

### **Наследование видоспецифических признаков у *T. polonicum***

При скрещиваниях, где в качестве отцовской формы были взяты виды *T. aethiopicum* и *T. dicoccoides* признак длина колосковой чешуи достоверно наследуется по материнскому типу. Однако, при скрещивании с *T. dicocum*

результаты противоречивые. Достоверное наследование признака безостости колоса по материнскому типу, было получено во всех скрещиваниях, где в качестве отцовской формы был взят вид *T. dicoccum*.

В последнем типе скрещиваний, когда в роли отцовского растения был взят вид *T. dicoccum*, если по признаку безостости все растения в F<sub>2</sub> гибридов наследуют эти признаки по материнскому типу *T. polonicum*, то анализируя признак форма колоса, можно наблюдать проявление спельтоидной формы колоса в большинстве полученных в F<sub>2</sub> гибридов, т.е. проявление наследования формы колоса по отцовскому типу.

### **Наследование видоспецифических признаков у *T. carthlicum***

Анализируя данные, можно сделать вывод, что при скрещивании, где в качестве отцовской формы взят вид *T. dicoccum* нормальная форма колоса наследуется моногенно по материнскому типу в обеих повторностях, в то время как отсутствие дополнительной ости наследуется также по материнскому типу, однако достоверно только в одной повторности из двух.

Анализируя признак «тетраостость» можно сделать вывод, что в обоих скрещиваниях, как с видом *T. dicoccum*, так и с видом *T. polonicum* – наследование идёт по отцовскому типу, т.е. признак в гибридной комбинации не доминирует, однако достоверно это только относительно вида *T. dicoccum*. Помимо названных выше признаков, нужно отметить, что при скрещивании *T. carthlicum* × *T. polonicum* признаки «отсутствие остей» и «удлинённая колосковая чешуя», наследуются по отцовскому типу.

Следующим этапом нашей работы оказалось фенотипирование архитектуры колоса. Были выбраны модели для визуализации морфологии колоса, в частности: радиальная модель, а также модели сечений и четырехугольников. Характеристики вышеописанных моделей с использованием подходов машинного обучения были применены для предсказания плотности колоса и его типа (спельтоидный, нормальный и компактный).

Совокупность собранного материала позволила создать цифровую коллекцию колосьев различных видов пшеницы. С использованием созданной цифровой коллекции можно будет создать цифровой классификатор для разновидностей, который будет построен на основании видоспецифических признаков растений пшеницы. Образцы растений фотографируются и документируются. Далее проводится анализ изображений для занесения полученной информации в цифровую коллекцию. На основании этого может быть произведено компьютерное обучение для распознавания видов и разновидностей. Цифровые определители лучше образных, т.к. позволяют однозначно определять видовую принадлежность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс фенотипирования (быстрая и корректная оценка морфологических параметров растений), тесно ассоциированный с классификацией видов, является одной из основополагающих задач в ходе выполнения селекционно-генетических экспериментов. В настоящее время используется ряд подходов для повышения эффективности фенотипирования колосьев пшеницы: реализация технологий анализа цифровых изображений, применение алгоритмов машинного обучения для обработки, а также устройство хранения информации в цифровых коллекциях.

В последние два десятилетия систематика растений, включая пшеницы род *Triticum* L., активно пересматривается. Разработка современных подходов позволяет существенно увеличить объём информации о наследовании таксономически значимых признаков у видов злаковых, в частности пшеницы. Исследование хозяйственно важных признаков пшеницы по данным предшествующих работ легло в основу таксономии и эволюции пшениц при их рассмотрении в историческом аспекте. Благодаря современным молекулярным методам, в частности, данным об изменчивости нуклеотидных последовательностей, становится возможным не только установить филогенетические взаимоотношения, но и провести оценки дивергенции таксонов рода с учётом временных рамок.

Важным аспектом по развитию систематики и генетики пшениц следует считать цифровые коллекции её видов и создание на их основе базы данных образцов растений. Для определения видовой принадлежности образца необходимо иметь полную информацию о морфологических признаках не только колоса, но и зерновки. Новые образцы растений с высокой вероятностью можно соотенести с определённым видом, зная ключевые видоспецифические структурные параметры колоса. Это позволяет осуществлять контроль за подлинностью образцов и сохранять аутентичность коллекций.

## ВЫВОДЫ

1. Таксономически значимые качественные признаки, определяющие архитектуру колоса (спельтоидность, компактность, округлозёрность, ветвистоколосость, тетраостость, полоникумность) переведены в количественные и установлены базисные параметры колоса для автоматического разделения цифровых изображений, посредством применения биоинформатического анализа и нейронных сетей, то есть признаки, описывающие форму колоса (индексы округлости и закруглённости), физические размеры тела колоса (периметр колоса без остей, длина ломаной линии вдоль оси колоса) и площадь остей, связанные в своём проявлении с видоспецифическими признаками пшениц.

2. На основании гибридологического анализа и изучения характера наследования тетраплоидных видов пшениц, моногенный тип наследования характерный для следующих видоспецифических признаков: спельтоидность, безостость, удлинённая колосковая чешуя, тетраостость, тип зубца на колосковой чешуе, плечо на колосковой чешуе, опушение колосковой чешуи, ветвистоколосость, использован для выделения реперных (типовых) образцов видов пшениц для расширения базы данных. Наследование остальных признаков пшениц требует дополнительного детального изучения (окраска колоса, наличие плешки на колосковой чешуе, дополнительная ость, бородка у основания колоска, компактоидность, характер выраженности остистости).

3. Впервые создана цифровая коллекция колосьев видов пшениц на трёх уровнях плоидности по архитектонике колоса.

4. С помощью создания цифровых коллекций и применения биоинформатического анализа и методов машинного обучения возможно разделение цифровых изображений колосьев по уровням плоидности. Созданный на её основе цифровой определитель лучше образных, так как позволяет с высокой вероятностью определять видовую принадлежность тестируемых образцов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. **Кручинина Ю.В.** Систематика рода *Triticum* L.: история изучения и вектор развития. / Ю. В. Кручинина // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 9. - № 3. – С. 162-171. - DOI: 10.18699/LettersVJ-2023-9-18

2. Artemenko N.V. Image-based classification of wheat spikes by glume pubescence using convolutional neural networks. / N.V. Artemenko, M.A. Genaev, R.U.I. Epifanov, E.G. Komyshev, **Y.V. Kruchinina**, V.S. Koval, N.P. Goncharov, D.A. Afonnikov // Front. Plant Sci. – 2024. - DOI: 10.3389/fpls.2023.1336192 (Q1)

3. Смоленская С.Э. Скороспелость и морфотип сортов мягкой пшеницы Западной и Восточной Сибири / С.Э. Смоленская, В.М. Ефимов, **Ю.В. Кручинина**, Б.Ф. Немцев, Г.Ю. Чепурнов, Е.С. Овчинникова, И.А. Белан, Е.В. Зуев, В.В. Пискарев // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2022. — Т. 26. - № 7. — С. 662-674. - DOI: 10.18699/VJGB-22-81

4. Vavilova V.Yu. Genetic Variability of *Btr1* Genes In Tetraploid Wheat Species and *Aegilops speltoides* Tausch. / V.Yu. Vavilova, I. Konopatskaia, A. Blinov, E.Ya. Kondratenko, **Y.V. Kruchinina**, N.P. Goncharov // Russian journal of genetics. — 2022. —Vol. 58. - № 6. — P. 684-697. - DOI: 10.1134/S1022795422060138

5. Пронозин А.Ю. Автоматическое фенотипирование морфологии колоса тетра- и гексаплоидных видов пшеницы методами компьютерного зрения / А.Ю. Пронозин, А.А. Паулиш, Е.А. Заварзин, А.Ю. Приходько, Н.М. Прохошин, **Ю.В. Кручинина**, Н.П. Гончаров, Е.Г. Комышев, М.А. Генаев // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2021. — Т. 25. - № 1. — С. 71-81. - DOI: 10.18699/VJ21.009
6. Vavilova V. Genetic variability of spelt factor gene in *Triticum* and *Aegilops* species / V. Vavilova, I. Konopatskaia, A.G. Blinov, E.Ya. Kondratenko, **Yu.V. Kruchinina**, N.P. Goncharov // BMC Plant Biol. — 2020. — № 20. — P. 310. - DOI: 10.1186/S12870-020-02536-8 (Q1)
7. Genaev M.F. Morphometry of the wheat spike by analyzing 2D images / M.F. Genaev, E.G. Komyshev, **Y.V. Kruchinina**, N.P. Goncharov, D.A. Afonnikov, N.V. Smirnov // Agronomy. — 2019. — № 7. — P. 390. – DOI 10.3390/agronomy9070390 (Q1)

### Тезисы

1. Komyshev E. Spikes morphometric characteristics analysis of five species of wheat / E. Komyshev, **Yu. Kruchinina**, M. Genaev, V. Koval, D. Afonnikov, N. Goncharov // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/Sb-2020): The Twelfth International Multiconference Abstracts, Novosibirsk, 06–10 июля 2020 года. – Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 2020. – P. 324. DOI: 10.18699/BGRS/SB-2020-203
2. **Кручинина Ю.В.** Наследование таксономически значимых признаков и скороспелости у ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшениц / Ю.В. Кручинина, Г.Ю. Чепурнов // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге: Сборник тезисов конференции, Санкт-Петербург, 25–29 апреля 2022 года. – Санкт-Петербург: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 2022. – С. 145-146.
3. Artemenko N.V. Glume pubescence classification of wheat using computer vision techniques / N.V. Artemenko, M.A. Genaev, **Y.V. Kruchinina** // The 7th International Scientific Conference (July 10–15, 2023, Kazan, Russia). – Kazan: FEN, 2023. – P. 52. DOI: 10.18699/PlantGen2023-07
4. **Kruchinina Y.V.** Study of species-specific traits and earliness in wheat of different levels of ploidy // The 7th International Scientific Conference (July 10–15, 2023, Kazan, Russia). – Kazan: FEN, 2023. – P. 217.
5. **Кручинина Ю.В.** Изучение наследования классификационных признаков и скороспелости у пшениц // Генофонд и селекция растений: Материалы 7-й Международной конференции «Генофонд и селекция растений», посвященной 95-летию академика РАН П.Л. Гончарова (Новосибирск, Россия, 10–12 апреля 2024 г.) – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2024. – С.175-179. DOI: 10.18699/GPB2024-45