Благодарности: Исследование было выполнено за счет средств Курчатовского геномного центра (075-15-2019-1662).

Список литературы

1. Yoshioka M., Iehisa J.C.M., Ohno R., Kimura T., Enoki H., Nishimura S., Nasuda S., Takumi S. Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. Plos one, 2017.
2. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.
3. Wang D., Yu K., Jin D., Sun L., Chu J., Wu W., Xin P., Li X., Sun J., Yang W., Zhan K., Zhang A., Liu D. ALI-1, candidate gene of B1 locus, is associated with awn length and grain weight in common wheat. BioRxiv, 2019.
4. Sourdille P., Cadalen T., Gay G., Gill B., Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. Plant Breed, 2002. 121: 320–324 c.

DOI 10.18699/GPB2020-43

Разработка генетико-селекционного подхода для получения новых сортов ячменя с повышенным содержанием антоцианов в зерне

Кукоева Т.В.^{1}, ст. лаборант-исследователь; Стрыгина К.В.², с.н.с.; Глаголева А.Ю.¹ аспирант, м.н.с.; Григорьев Ю.Н.³, с.н.с.; Шоева О.Ю.¹, с.н.с., зав. сектором; Хлесткина Е.К.^{1,2}, в.н.с., директор ВИР.*

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия;

²Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия;

³СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия.

*e-mail: kukoeva@bionet.nsc.ru

Необходимость создания исходного материала и сортов ячменя с повышенным содержанием антоцианов для функционального питания становится все более ощутимой как для России в целом, так и для Сибирского региона в частности. В предложенной работе на основе знаний о молекулярно-генетических механизмах формирования признаков антоциановой пигментации у ячменя были разработаны и реализуются на практике оптимальные схемы получения новых сортов с повышенным содержанием антоцианов в зерне.

Ключевые слова: Hordeum vulgare, маркер-ориентированная селекция, перикарп, алейрон, фиолетовое зерно, голубое зерно.

Development of a genetic-breeding approach for obtaining new varieties of barley with an increased content of anthocyanins in grain

Kukoeva T.V., Senior Laboratory Assistant Researcher,

FRC Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Lavrentjev ave., 10.

**e-mail: kukoeva@bionet.nsc.ru*

The necessity of creation of source material and varieties of barley with a high content of anthocyanins for functional nutrition is becoming more and more tangible for Russia as a whole and for the Siberian region in particular. In the proposed work, on the basis of knowledge about the molecular-genetic mechanisms of the anthocyanin pigmentation formation in barley, optimal schemes for breeding new varieties with a high content of anthocyanins in grain were developed and put into practice.

Key words: Hordeum vulgare, marker-assisted breeding, pericarp, aleurone, purple grain, blue grain.

Помимо важных функций, выполняемых флавоноидными соединениями в жизни растений, связанных с регуляцией роста и развития, а также адаптацией к стрессу, показана функциональная активность этих соединений для здоровья человека. С потреблением флавоноидных пигментов антоцианов связывают уменьшение риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний [1]. В связи с этим в последнее время в мире наблюдается повышенный интерес к созданию новых сортов культурных растений, обогащенных антоциановыми соединениями, в том числе зерна злаков.

У ячменя антоцианы могут присутствовать в вегетативных органах, таких как листовые пластинки, листовые влагалища, ушки листового влагалища, стебель, ости, жилки колосковой чешуи и основание растения, а также в зерне, придавая ему фиолетовую и голубую окраски [2]. К настоящему времени выделены нуклеотидные последовательности регуляторных генов *Ant1* (картирован в коротком плече хромосомы 7H) и *Ant2* (2HL), контролирующих фиолетовую окраску зерна ячменя, обусловленную накоплением антоцианов в перикарпе, и генов *HvMpc2* (4HL), *HvMyc2* (4HL), *HvWD40* (6HL), определяющих голубую окраску зерна за счет накопления антоцианов в алейроновом слое [2]. На основании выделенных нуклеотидных последовательностей этих генов были разработаны диагностические ДНК-маркеры, позволяющие уже во втором поколении (F_2) отбирать гомозиготные по соответствующим генам растения (таблица).

Таблица – ДНК-маркеры, используемые для отбора гомозиготных гибридов по генам *Ant1*, *Ant2*, *HvMyc2*

Ген	Длина ПЦР-продукта, п.н.	Структура прямого праймера (5' → 3')	Структура обратного праймера (5' → 3')	Т отжига (°C)	Ссылка
<i>Ant1</i>	455/488	gcggttgattgtttcata	tttaaatggcgaggttaagg	55	[3]
<i>Ant2</i>	268/447	gccgtgtgttccttagt	cgaaccaacaacagcgagac	55	[4]
<i>HvMyc2</i>	610-611*	caagtaggtccgaaggctct	cgggcactttacctccaaca	60	[5]

* полученный ПЦР-продукт обрабатывался эндонуклеазой рестрикции *BseI* I и детектировался полиморфизм рестрикционных фрагментов.

Для создания исходного селекционного материала ячменя в качестве материнских форм нами были выбраны районированные сибирские сорта Ворсинский 2, Алей, Танай, а в качестве отцовских форм – почти-изогенные линии сорта Bowman ‘Intence blue aleurone’ (BA) и ‘Purple lemma and pericarp’ (PLP) из коллекции NordGen (www.nordgen.org), являющиеся донорами доминантных аллелей генов *HvMyc2* и *Ant1/Ant2* соответственно.

С помощью CAPS-маркера, разработанного к гену *HvMyc2*, в популяции F₂ были отобраны гомозиготные по этому гену растения: из 83 гибридов Ворсинский2 x BA было отобрано 31 растение, из 72 гибридов Танай x BA – 25, из 56 гибридов Алей x BA – 29 растений. Эти растения будут подвергнуты 5–6 кратному возвратному скрещиванию и маркер–контролируемому отбору гомозиготных растений.

Для получения образцов с фиолетовой окраской зерна необходимо наличие доминантных аллелей двух генов – *Ant1* и *Ant2*. Поскольку ген *Ant1* имеет плеiotропный эффект и определяет как окраску зерна, так и листового влагалища, выбор оптимальной схемы отбора зависит от наличия и интенсивности антоциановой окраски листового влагалища у сорта-реципиента. Если исходный генотип имеет окраску листового влагалища, тогда отбор с помощью ДНК-маркеров можно вести лишь по гену *Ant2*. Если исходный генотип не имеет окраски листового влагалища, тогда отбор с помощью ДНК-маркеров необходимо вести по двум генам – *Ant1* и *Ant2*. В качестве морфологического маркера доминантного аллеля гена *Ant1* можно использовать признак окраски листового влагалища.

Для выбора оптимальной схемы отбора нами было исследовано содержание антоцианов в листовом влагалище у 30 сортов сибирской селекции, в качестве контроля была взята почти изогенная линия BA, у которой содержание антоцианов, оцененное с помощью спектрофотометра при длине волны 530 нм, было самое высокое и для растений, растущих в поле и в теплице, составляло 1.72 и 4.87 оптических единиц соответственно. Содержание антоцианов у сибирских сортов варьировало от 0.12 до 2.50 оптических

единиц, при этом наблюдались количественные различия у сортов в зависимости от условий произрастания. Сорта, взятые нами в селекционный процесс в качестве материнских форм (Танай, Алей, Ворсинский2), имели низкое и среднее содержание антоцианов во влагалищном листе. На основе гибридов F₁, были получены растения поколения F₂, среди которых был проведен отбор растений с окрашенным стеблем. С помощью SNP-маркеров к генам *Ant1* и *Ant2* были отобраны гомозиготные растения: из 64 гибридов Танай x PLP – 14, из 43 гибридов Алей x PLP – 5, из 49 гибридов Ворсинский 2 x PLP – 7 гомозиготных растений. Все эти растения будут в дальнейшем подвергнуты 5-6 кратному возвратному скрещиванию и маркер-контролируемому отбору гомозиготных растений. Нами также были выбраны в качестве сортов-реципиентов сорта Golden Promise, Биом, Красноярский1, характеризующиеся средним и высоким содержанием антоцианов в листовом влагалище. Они были скрещены с линией 18, имеющей генотип *ant1ant1Ant2Ant2* [6]. Так как доминантный аллель гена *Ant1* присутствует у исходных сортов, селекция фиолетовозерных генотипов на их основе возможна с использованием ДНК-маркера только к гену *Ant2*. Насколько интенсивной будет окраска зерновки в зависимости от окраски листового влагалища исходного сорта, можно будет оценить на стадии гибридов поколения F₂.

Используя все новые методы селекции, а так же накопленную информацию о генах, контролирующие процесс биосинтеза флавоноидов, мы можем упростить и сократить процесс получения новых сортов с повышенным содержанием антоцианов в зерновке.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00140.

Список литературы

1. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchrobook, 2013.
2. Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018; 22 (3). 333–342 с.
3. Shoeva O.Y., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. 2015. Barley *Ant1* is a homolog of maize *C1* and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath // Plant Breeding. V. 134. – P. 400–405.
4. Shoeva O.Y., Mock H.P., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare*. PloS one. 2016; 11 (10).
5. Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone // BMC Plant Biology 2017, 17 (Suppl 1):184.
6. Gordeeva E.I., Glagoleva A.Y., Kukoeva T.V., Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. 2019. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network // BMC Plant Biology. 19 (Suppl 1): 52.