

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

на правах рукописи

Гордеева Елена Ивановна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ
ФИОЛЕТОВОЙ ОКРАСКИ ПЕРИКАРПА ЗЕРНА
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Хлесткина Е.К.

Новосибирск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Флавоноидные пигменты в зерне пшеницы: локализация, химический состав, генетический контроль и практическое значение	12
1.1.1. Локализация и химический состав флавоноидных пигментов в зерновке пшеницы.....	13
1.1.2. Практическое значение флавоноидных пигментов, содержащихся в зерновке пшеницы и других злаковых растений.....	16
1.1.3. Генетический контроль синтеза флавоноидных пигментов в зерновке пшеницы	18
1.2. Комплекс ферментов и генов, вовлеченных в биосинтез флавоноидных пигментов у растений.....	21
1.3. Генетические модели для исследования локализации и функциональной организации генов пшеницы и методы их создания.....	36
Заключение к Главе 1.....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1. Растительный материал.....	43
2.2. Методы	46
2.2.1. Фенотипирование растений.....	46
2.2.2. Генотипирование	47
2.2.2.1. Микросателлитные маркеры	47
2.2.2.2. Выделение ДНК	48
2.2.2.3. Полимеразная цепная реакция	49
2.2.2.4. Электрофоретический анализ ДНК.....	49
2.2.3. Анализ транскрипции.....	50
2.2.3.1. Выделение РНК, обратная транскрипция.....	50
2.2.3.2. Количественная ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции.....	50
2.2.4. Выделение и анализ содержания антоцианов	52
2.2.5. Методы статистического и компьютерного анализа.....	52
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	53
3.1. Маркер-контролируемое получение изогенных линий пшеницы с различными комбинациями аллелей в локусах <i>Pp-A1</i> , <i>Pp-D1</i> и <i>Pp3</i>	53
3.1.1. Схема скрещивания (гибридизация и фенотипирование)	53
3.1.2. Маркер контролируемый отбор полученных растений пшеницы.....	54
3.1.2.1. Оценка возможности использования маркера <i>Rc</i>	55
3.1.2.2. Отбор растений с помощью фенотипических маркеров.....	56
3.1.2.3. Отбор изогенных линий с помощью молекулярных маркеров.....	58
3.2. Анализирующие скрещивания	60
3.3. Изучение относительного содержания антоцианов в цельном зерне изогенных линий пшеницы.....	63
3.4. Изучение функциональной роли отдельных генов <i>Pp</i> в регуляции транскрипции генов биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна пшеницы.....	64

3.4.1. Экспрессия генов <i>Chi</i> и <i>F3h</i> в перикарпе изогенных линий	64
3.4.2. Использование полученных линий для изучения взаимодействия между генами <i>Pp</i>	67
Заключение к Главе 3.....	69
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	71
4.1. Маркер-контролируемое получение растений с заданным генотипом.....	71
4.2. Гомеологичные копии генов <i>Pp</i>	73
4.3. Новые изогенные линии как удобная генетическая модель	76
4.4. Особенности регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	117

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 2-ODD – 2-оксоглутаратзависимая диоксигеназа
- 4CL – 4-кумарат:КоА лигаза
- OT – обратная транскрипция
- п.н. – пара нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- C29 – сорт мягкой пшеницы Саратовская 29
- ABC – АТФ-связывающий кассетный транспортер (ATP-Binding Cassette transporter)
- ACE – ACGT-содержащий элемент, *cis*-регуляторный элемент, распознаваемый bZIP транскрипционными факторами (ACGT-containing element)
- AFLP – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (amplified fragment length polymorphism)
- ANR – антоцианидинредуктаза
- ANS – антоцианидинсинтаза
- AVI – вакуолярные включения молекул антоцианов (anthocyanin vacuolar inclusions)
- AT – ацетилтрансфераза
- bHLH – bHLH основной спираль-петля-спираль домен, распознающий ДНК (basic helix-loop-helix)
- BTL – белки транспортеры, локализованные в тонопласте и плазматической мембране (bilitranslocase)
- C1 – ген кукурузы, контролирующей антоциановую окраску щитка и алейронового слоя (colorless1)
- C4H – циннамат-4-гидроксилаза
- CAPS – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (cleaved amplified polymorphic sequences)
- CHI – халконфлаванонизомераза
- CHS – халконсинтаза
- DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза
- F3H – флаванон-3-гидроксилаза
- F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза
- F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза
- GST – глутатион-S-трансфераза
- GT – гликозилтрансфераза
- ISSR – межмикросателлитные последовательности (inter simple sequence repeats)
- Lc (R)* – ген кукурузы, контролирующей антоциановую окраску перикарпа зерна, верхней и нижней цветковой и колосковой чешуи, ушек листового влагалища, лигулы и главной жилки листа (leaf color)
- LAR – лейкоантоцианидинредуктаза
- MATE – смешанные транспортеры (multidrug and toxin extrusion transporter)
- Mrc1 – MYB подобный белок C1 (MYB-like protein C1)
- MRE – MYB-расознаваемый элемент, *cis*-регуляторный элемент, распознаваемый MYB-подобными факторами транскрипции (MYB-recognition element)
- MT – метилтрансфераза
- P – сорт мягкой пшеницы Purple
- PF – сорт мягкой пшеницы Purple Feed

PAL – фенилаланинаммиаклиаза

Pan – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (пурпурную) окраску пыльников (purple anthers)

PA – проантоцианидины

Pc – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (фиолетовую) окраску стебля (purple culm)

Plb – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (фиолетовую) окраску листовых пластинок (purple leaf blades)

Pls – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (фиолетовую) окраску листовых влагалищ (purple leaf sheaths)

Pp – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (фиолетовую) окраску перикарпа зерна пшеницы (purple pericarp)

PVC – предшественник вакуолярных включений (pre-vacuolar compartment)

R – ген пшеницы, контролирующий красную окраску зерна (red grain)

Ra – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (красную) окраску ушек листового влагалища (red auricles)

RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (random amplified polymorphic DNA)

Rc – ген пшеницы, контролирующий антоциановую (красную) окраску колюптите (red coleoptile)

RFLP – полиморфизм длины рестриционных фрагментов (restriction fragment length polymorphism)

Rg – ген пшеницы, контролирующий красную окраску колосковых чешуй (red glume)

RRE – R-распознаваемый элемент, *cis*-регуляторный элемент, распознаваемый bZIP транскрипционными факторами (R-response element)

RT – рамнозилтрансфераза

SCAR – последовательность, характеризующая амплифицированную область (sequence characterized amplified region)

SNARE – белковые рецепторы, чувствительные к N-этилмалеимиду (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism)

SSAP – полиморфизм специфично-амплифицированных последовательностей (sequence-specific amplification polymorphism)

SSR – простые повторяющиеся последовательности (simple sequences repeats)

STS – последовательности, характеризующие локус (sequences tagged site)

UBC – убиквитин

YP – сорт мягкой пшеницы Yanetzki's Probat

ZmMRP3 – ген кукурузы, кодирующий транспортер ABC-типа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Среди дополнительных источников антиоксидантных соединений, употребляемых в пищу и необходимых для здоровья человека, в настоящее время все чаще рассматриваются продукты зерновых злаков, содержащих флавоноидные пигменты – растительные соединения фенольной природы. Синтез различных окрашенных флавоноидных соединений в определенных структурах зерна злаковых растений приводит к появлению окраски. Так, в результате синтеза антоцианов семена злаков могут приобретать окраску различных оттенков от голубовато-серого и красноватого до темно-фиолетового и почти черного. Другие классы флавоноидных соединений обуславливают окрашивание зерна в красновато-коричневый (проантоцианидины) или темно-коричневый (флобафены) цвет. Среди перечисленных соединений, придающих различную окраску зерну злаковых растений, наибольшим антиоксидантным потенциалом обладают антоцианы (Abdel-Aal, 2006; Knieval et al., 2009). Данные соединения могут накапливаться в различных частях растения. Их основная физиологическая роль заключается в защите растений от избыточного УФ-излучения. Также содержание антоцианов как правило возрастает при неблагоприятном воздействии окружающей среды (засуха, холод, засоление и т.д.; Chalker-Scott, 1999).

У наиболее распространенной злаковой культуры пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) зерно может быть неокрашенным, либо имеет красновато-коричневый, голубовато-серый или фиолетовый оттенок. Различия по окраске обусловлены накоплением определенных флавоноидных пигментов в разных слоях оболочки зерна пшеницы. Синтез проантоцианидинов в семенной оболочке приводит к появлению красновато-коричневого оттенка (признак «красное зерно» - «red grain») и контролируется генами *R*, локализованными в третьей гомеологической группе хромосом пшеницы. Голубовато-серый оттенок появляется вследствие синтеза

антоцианов в алейроновом слое (признак «голубой алейрон» - «blue aleurone») и регулируется генами *Va*, привнесенными в геном пшеницы мягкой от дикорастущих сородичей за счет транслокаций в хромосомах четвертой гомеологической группы. Фиолетовая окраска обусловлена синтезом антоцианов в клетках перикарпа (признак «фиолетовый перикарп» - «purple pericarp»). Этот признак регулируется двумя комплементарными доминантными генами: *Pp-D1* (хромосома 7D) и *Pp3* (хромосома 2A) (Zeven, 1991; McIntosh et al., 2008, 2013).

Введение генов, контролирующих биосинтез антоцианов в перикарпе зерна, может повысить питательную ценность цельнозерновых продуктов, производимых из данных сортов. Направленное введение целевых генов при селекции сортов пшеницы требует знаний о механизмах генетической регуляции и о структурно-функциональной организации и локализации отдельных генов, участвующих в формировании целевого признака. В связи с этим изучение функциональной организации новых и уже известных генов, контролирующих фиолетовую окраску перикарпа, является актуальной задачей. Для установления функциональной роли отдельных генов *Pp* путем сравнительного анализа активности генов биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна наиболее подходящей моделью являются почти изогенные линии, несущие разные комбинации доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp*.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования заключалась в выявлении особенностей генетической регуляции фиолетовой окраски перикарпа зерна пшеницы путем создания и анализа изогенных линий. В работе были поставлены следующие задачи:

1. На основе гибридизации и отбора растений с помощью микросателлитных маркеров получить изогенные линии пшеницы с различными комбинациями аллелей в локусах *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*.

2. Показать возможность использования полученных линий для тестирования генетического материала на присутствие одного из комплементарных генов *Pp*.
3. Охарактеризовать полученные изогенные линии пшеницы с различными комбинациями аллелей в локусах *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3* по содержанию антоцианов в зерне.
4. Установить функциональную роль отдельных генов *Pp* в регуляции транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна пшеницы.
5. Установить влияние различных аллелей генов *Pp* и их комбинаций на уровень транскрипции регуляторного гена *TaMyc1*.

Научная новизна работы. В настоящей работе созданы новые изогенные линии яровой мягкой пшеницы, содержащие различные комбинации генов *Pp*. С помощью данных линий получены новые сведения, раскрывающие особенности генетической регуляции биосинтеза антоциановых пигментов в перикарпе зерна пшеницы, а именно: впервые показано, что регуляторные гены *Pp-1* и *Pp3* не могут по отдельности активировать в перикарпе структурный ген *F3h*, но при этом другой структурный ген, *Chi*, может активироваться в присутствии одного гена: *Pp-1* или *Pp3*; в хромосоме 7A пшеницы выявлен новый ген – *Pp-A1*; впервые у растений установлено, что MYB-подобный регуляторный фактор биосинтеза антоцианов способен частично супрессировать MYC-кодирующий регуляторный ген.

Теоретическая и практическая ценность работы.

Линии, полученные в работе, а также результаты их генотипирования и анализа транскрипции генов *Chi*, *F3h* и *TaMyc1* в перикарпе данных линий представляют значимость для дальнейших исследований, направленных на понимание механизмов регуляции генной сети биосинтеза флавоноидов.

Полученные линии могут использоваться в качестве доноров определенных аллелей *Pp*, а также для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp*. Кроме того, набор линий, полученных в работе, является подходящей моделью для серии дальнейших физиологических экспериментов, направленных на выявление взаимосвязи между синтезом антоцианов в перикарпе зерна пшеницы и устойчивостью к различным факторам биотического и абиотического стресса. Предложен список диагностических ДНК маркеров, рекомендуемых для использования в селекции пшеницы по признаку фиолетовой окраски зерна. Данные, полученные в работе, используются при чтении лекций в спецкурсе «Теория селекции» (ФЕН, НГУ).

Положения, выносимые на защиту.

1. В хромосоме 7А пшеницы находится локус *Pp-A1*, гомеологичный генам *Pp-B1* и *Pp-D1*, контролирующим фиолетовую окраску перикарпа зерна.
2. Между генами *Pp* существует взаимная регуляция: ген *Pp-D1* может вызывать частичную супрессию *Pp3*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 10 российских и международных конференциях, среди которых: III Международная конференция "Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution" (2010, Алушта), Международная Конференция "Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology" (2010, Новосибирск, 2012, Иркутск), 2-ая Международная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (2011, Москва, Звенигород), 15-ая международная конференция Европейского сообщества по анеуплоидам пшеницы EWAS (2011, Нови Сад, Сербия), 12-й Международный симпозиум по генетике пшеницы (2013, Йокогама, Япония), Международный симпозиум по генетике и селекции твердых пшениц (2013, Рим, Италия), Конференция ВОГиС

«Проблемы генетики и селекции» (2013, Новосибирск), Международная научно-практическая конференция "Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине" (2013, Новосибирск), VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы (2014, Ростов-на-Дону).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 2 статьи в сборнике трудов конференций, и 9 тезисов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 121 страницах печатного текста, включая 8 таблиц и 15 рисунков. Список цитированной литературы содержит 240 работ.

Личный вклад автора. Основные результаты работы были получены и проанализированы автором самостоятельно. В частности, автором выполнялась гибридизация растений на всех этапах работы, фенотипирование и генотипирование полученных растений, выделение РНК и количественная ОТ-ПЦР, статистическая обработка полученных данных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Различная окраска семян растений определяется содержанием в них флавоноидных пигментов. Флавоноиды - это вторичные метаболиты растений фенольной природы, основная функция которых связана с защитой и противодействием неблагоприятным условиям окружающей среды (Chalker-Scott, 1999). Некоторые из флавоноидных соединений являются окрашенными. Так, за окраску у злаков отвечают флобафены (коричневая окраска семян кукурузы), проантоцианидины (красные пигменты риса, пшеницы), антоцианы (фиолетовые и голубые пигменты риса, пшеницы).

Флавоноидные соединения являются естественными антиоксидантами (Prochazkova et al., 2011), их употребление в составе растительной пищи полезно для организма человека и благотворно влияет на различные патологические состояния, включая сердечно-сосудистые заболевания, артриты, различные виды рака и болезнь Альцгеймера (Wang et al., 2007; Pascual-Teresa et al., 2010; Cvorovic et al., 2010; Simoes, 2012; Pojer et al., 2013). Данные соединения также полезны в лечении сахарного диабета 2 типа и ожирения (Yawadio et al., 2007; Prior et al., 2008). Было показано, что антоцианы могут ингибировать окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и уменьшать агрегацию тромбоцитов (Astadi et al., 2009; Pirro et al., 2013). В связи с этим в настоящее время наблюдается повышенный интерес к использованию продуктов из окрашенных зерен злаков. В частности, в настоящее время широко введены в производство продукты из цветных сортов кукурузы *Zea mays* L. (в Америке) и риса *Oryza sativa* L. (в Азии). Активно ведутся работы по созданию сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с аналогичными свойствами, так как она является основной злаковой культурой в большинстве стран мира, в том числе, в России.

За счет биосинтеза флавоноидных пигментов в различных частях зерновки пшеницы ее зерно может приобретать красновато-коричневый, голубовато-серый или фиолетовый оттенок. Краснозерные сорта пшеницы

распространены достаточно широко (это, например, все сорта, относящихся к разновидностям пшеницы *milturum* и *lutescence*), тогда как сорта, отличающиеся наиболее высоким содержанием антиоксидантов в зерне (сорта с голубым и фиолетовым зерном) встречаются пока крайне редко, а в нашей стране совсем не возделываются. Настоящий обзор посвящен рассмотрению физиологических, биохимических и генетических аспектов биосинтеза флавоноидных пигментов в зерне пшеницы и оценке современного состояния исследований в этом направлении.

1.1. Флавоноидные пигменты в зерне пшеницы: локализация, химический состав, генетический контроль и практическое значение

Мягкая пшеница (*T. aestivum* L.) является дисомным аллогексаплоидом ($2n = 6x = 42$, геном ВВААDD). Гексаплоидная пшеница появилась примерно 7-10 тысяч лет назад в результате гибридизации тетраплоидной культурной пшеницы *T. dicocum* с дикорастущим видом *Ae. tauschii* Coss. (синоним *Aegilops squarrosa* L.) (Gill et al., 1991). В состав генома мягкой пшеницы входит 21 пара хромосом (по семь пар хромосом в каждом субгеноме: А, В и D). Хромосомы пшеницы условно разделяют на семь гомеологических групп - по 3 пары хромосом в каждой.

Различия по окраске зерна, наблюдаемые среди сортов и линий пшеницы, обусловлены накоплением определенных флавоноидных пигментов в разных частях зерновки. Синтез проантоцианидинов в семенной оболочке приводит к появлению красновато-коричневого оттенка (признак «красное зерно» - «red grain»). Голубовато-серый оттенок появляется вследствие синтеза антоцианов в алейроновом слое (признак «голубой алейрон» - «blue aleurone»). Фиолетовая окраска обусловлена синтезом антоцианов в клетках перикарпа (признак «фиолетовый перикарп» - «purple pericarp»). Эти три типа окраски (рис. 1) контролируются различными генами, локализованными в разных гомеологических группах хромосом (табл. 1).

1.1.1. Локализация и химический состав флавоноидных пигментов в зерновке пшеницы

Зерновка пшеницы формируется из двух сросшихся плодолистиков завязи и представляет собой сухой односемянный нераскрывающийся плод злаков, который в агрономической практике обычно называют зерном. Зерновка содержит в себе собственно семя, состоящее из зародыша, эндосперма и семенных оболочек, и плодовую оболочку (перикарп), плотно прилегающую к семенной кожуре и срастающуюся с семенем только вблизи основания в пределах бороздки (рис. 1).

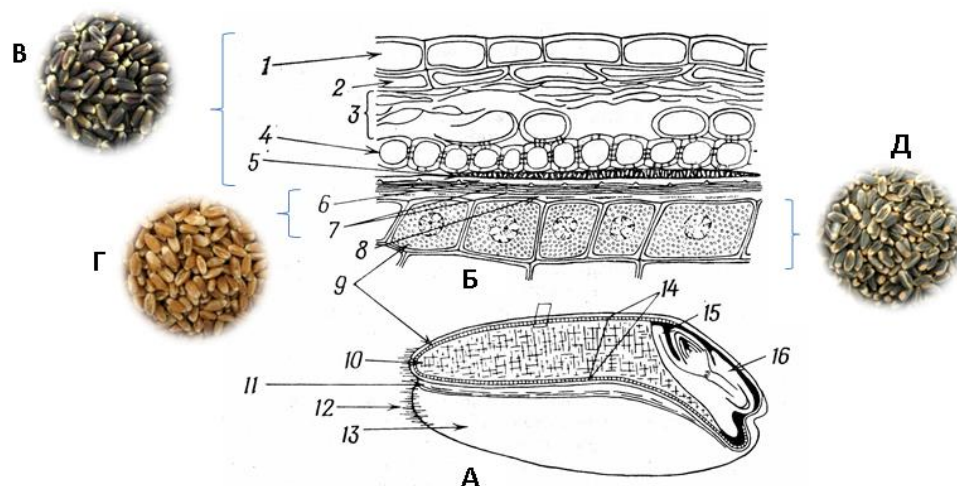


Рис. 1. Строение зерновки пшеницы (по Эсау, 1969). **А:** продольный разрез. **Б:** увеличенный фрагмент, выделенный прямоугольником на рис. А. **В:** фиолетовая окраска зерна за счет синтеза антоцианов в клетках перикарпа (1-5), **Г:** красная окраска зерна за счет синтеза проантоцианидинов в клетках семенной оболочки (6-7), **Д:** голубая окраска зерна за счет синтеза антоцианов в алейроновом слое (9). 1 – эпидермис, 2 – субэпидермальный слой, 3 – разрушенная паренхима, 4 – поперечные клетки, 5 – трубчатые клетки, 6 – слой кутикулы, 7 – внутренний слой внутреннего интегумента, 8 – разрушенные клетки нуцеллуса, 9 – алейроновый слой, 10 – крахмалоносный эндосперм, 11 – бороздка, 12 – эпидермальные волоски, 13 – поверхность перикарпа, 14 – эндосперм, 15 – щиток, 16 – зародыш.

Плодовая оболочка (перикарп, или перикарпий: от греч. *peri* - около, *carpos* - плод) формируется из стенок завязи и состоит из нескольких слоев: эпидермиса, субэпидермального слоя, паренхимы, поперечных, продольных и трубчатых клеток. Антоцианы в перикарпе синтезируются преимущественно в наружном эпидермальном слое и придают зерну

фиолетовый оттенок (рис. 1В). Семенная оболочка (семенная кожура, периспермий, *testa*) образуется из оболочек семяпочки (интегументов); накопление в ней проантоцианидинов придает зерну красновато-коричневый оттенок (рис. 1Г).

Периферийный слой эндосперма, прилегающий к семенной оболочке, получил название алейронового, так как содержит особые белковые образования, алейроновые зерна, и почти не содержит крахмала. Этот слой представлен одним рядом клеток с сильно утолщенными стенками. При помоле пшеницы он отделяется от мучнистого ядра преимущественно с оболочками в виде отрубей. Антоцианы, синтезируемые в клетках алейронового слоя, придают зерну голубовато-серый оттенок (рис. 1Д). В отсутствие генов, необходимых для активации биосинтеза флавоноидных пигментов, зерно пшеницы имеет желтоватую окраску, сорта пшеницы с таким зерном называют «белозерными».

Биохимический анализ пигментов зерна пшеницы позволил установить конкретные соединения из классов антоцианов и проантоцианидинов, которые синтезируются в определенных слоях зерновки и придают зерну характерные оттенки (табл. 1). На основании позитивной корреляции между интенсивностью красной (красно-коричневой) окраски зерна и количеством флавоноидных соединений катехина и катехин-таннина в незрелом зерне было установлено, что основным пигментом, окрашивающим оболочку зерна пшеницы, является красно-коричневый флавоноидный пигмент, производный катехинов (Miyamoto and Everson, 1958). Авторы предположили, что данный пигмент может относиться к флобафенам. Однако в настоящее время методами структурно-функциональной геномики было выявлено, что гены *R* регулируют транскрипцию гена *F3h* (Himi and Noda, 2005), участие которого в биосинтезе флобафенов не требуется, но является необходимым для получения проантоцианидинов, следовательно, красная окраска зерна пшеницы обусловлена накоплением

проантоцианидинов, которые наряду с флобафенами являются красно-коричневыми пигментами (Winkel-Shirley, 2001, 2002).

Из голубого зерна пшеницы выделено четыре основных антоциановых соединения, среди которых самым высоким содержанием отличается дельфинидин-3-гликозид (45% от общего содержания антоцианов в зерне). Из фиолетового зерна выделено пять основных антоциановых соединений, среди них самый характерный – цианидин-3-гликозид (Abdel-Aal, 2006; Knievel et al., 2009; Trojan, 2014).

Таблица 1. Признаки окраски зерна пшеницы, основные соединения, обуславливающие окраску, и генетический контроль их биосинтеза.

Название признака	«Красное зерно»	«Фиолетовый перикарп»	«Голубой алейрон»
Цвет созревшего зерна	Красновато-коричневый	Темно-фиолетовый или коричневатый	Голубовато-серый
Локализация пигмента	Семенная оболочка	Перикарп	Алейроновый слой эндосперма
Основные соединения, придающие окраску	Проантоцианиды (производные катехинов и лейкоантоцианидинов) (Miyamoto and Everson, 1958)	Цианидин-3-гликозид (антоциановое соединение) (Abdel-Aal, 2006)	Дельфинидин-3-гликозид (антоциановое соединение) (Knievel et al., 2009)
Гены, контролирующие наличие пигмента	<i>R-A1, R-B1, R-D1</i> (Sears, 1954; Allan and Vogel, 1965; Metzger and Silbaugh, 1970; Gale et al., 1995; Flinham and Gale, 1995)	<i>Pp-1</i> и <i>Pp3</i> (Арбузова и др., 1998; Dobrovolskaya et al., 2006; Tereshchenko et al., 2012; Khlestkina et al., 2008a, 2009a, 2010a, 2011a)	<i>Va</i> (Dubcovsky et al., 1996; Singh et al., 2007; Арбузова и др., 2012)
Локализация генов в геноме	Третья гомеологическая группа хромосом (Flinham, Gale, 1995; Kuraparthi et al., 2008; Nalam et al., 2006; Li et al., 2010)	Седьмая гомеологическая группа хромосом и хромосома 2A (Dobrovolskaya et al., 2006; Tereshchenko et al., 2012; Khlestkina et al., 2008a, 2009a, 2010a, 2011a)	Четвертая гомеологическая группа хромосом (Dubcovsky et al., 1996; Singh et al., 2007; Арбузова и др., 2012)

1.1.2. Практическое значение флавоноидных пигментов, содержащихся в зерновке пшеницы и других злаковых растений

Известно, что флавоноиды обладают антиоксидантными свойствами, противодействуя разрушительной деятельности свободных радикалов. Антиоксидантные свойства обуславливают различные характеристики флавоноидов, полезные для здоровья человека. В частности, антоцианы обладают антимуtagenным и антигенотоксическим действием и способны противодействовать развитию раковых заболеваний (Lazze et al., 2003; Svorovic et al., 2010). Также флавоноидные соединения способствуют предотвращению сердечно-сосудистых заболеваний (Pascual-Teresa et al., 2010; Gani et al., 2012) и воспалительных процессов (Li et al., 2001; Wang and Mazza, 2002). Антоцианы могут использоваться для профилактики сахарного диабета и ожирения (Tsuda et al., 2003; Sasaki et al., 2007; Li et al., 2013), для улучшения остроты зрения (Matsumoto et al., 2003; Milbury et al., 2007) и предотвращения атеросклероза (Grassi et al., 2010; Wang et al., 2011; Simoes et al., 2012). Употребление флавоноидов также полезно для укрепления костей (Hardcastle et al., 2011; Macdonald-Clark and Macdonald, 2013).

Среди флавоноидов, придающих различную окраску зерну злаковых растений, наибольшим антиоксидантным потенциалом обладают антоцианы (Iqbal et al., 2005; Abdel-Aal et al., 2006; Chung and Shin, 2007; Knievel et al., 2009). На сегодняшний день основным источником антоцианов являются различные фрукты и овощи, среди которых наиболее богатыми антоцианами являются кожица винограда и краснокочанная капуста (Abdel-Aal et al., 2006). Однако появляется все больше информации о возможном использовании зерновых растений в качестве дополнительного источника антоцианов (Dykes and Rooney, 2007; Abdel-Aal et al., 2008). Причем готовые продукты не теряют антиоксидантную активность и рекомендуются для включения в рацион, в том числе в продукты, рекомендованные для детского питания (Hirawan et al., 2011).

Антоцианы содержатся в перикарпе зерна и алейроновом слое (Zeven, 1991), которые при сухом помолке отделяются от эндосперма и дают фракцию отрубей. Концентрация антоцианов в отрубях в десятки раз выше по сравнению с концентрацией антоцианов относительно общей массы зерна. Совершенствование методов экстракции данных соединений из отрубей и их дальнейшее концентрирование позволяет получить антоциановые соединения в достаточно большом количестве (Abdel-Aal et al., 2008). Была также продемонстрирована возможность увеличения содержания антоцианов комбинацией различных генов, контролирующих фиолетовую и голубую окраску зерна (Syed Jaafar et al., 2013).

Два вида антоцианов: цианидин-3-О-гликозид (85%) и пеонидин-3-О-гликозид (15%), - были выделены как основные компоненты из алейронового слоя пигментированного черного риса (*Oryza sativa* L.) (Yawadio et al., 2007). Выделенные соединения показали способность ингибировать активность альдозоредуктазы и, таким образом, могут быть рекомендованы для профилактики диабета взамен применяемых в настоящее время синтетических ингибиторов альдозоредуктазы, которые демонстрируют нежелательные побочные действия в организме человека (Van Zandt et al., 2004).

Также включение в рацион питания продуктов из окрашенного риса улучшает состояние пациентов с ишемической болезнью сердца (Wang et al., 2007), антоциановые компоненты черного риса являются ингибиторами агрегации тромбоцитов (Xia et al., 2006).

Так как зерновые злаки, в том числе пшеница, являются главными пищевыми продуктами, расширение исследований, направленных на понимание механизмов генетической регуляции биосинтеза флавоноидов в зерне, будет способствовать дальнейшему улучшению питательной ценности зерновых культур и, как следствие, улучшению здоровья человека.

1.1.3. Генетический контроль синтеза флавоноидных пигментов в зерновке пшеницы

Активация биосинтеза флавоноидных пигментов в разных слоях зерновки пшеницы контролируется различными генетическими системами (табл. 1). Все три признака: «красное зерно», «голубой алейрон» и «фиолетовый перикарп» контролируются доминантными генами. Важно отметить, что перикарп формируется из клеток материнского растения, поэтому семена в F_1 будут иметь тот цвет перикарпа, который наблюдался у материнского растения. При скрещивании гомозиготных растений, имеющих признаки «красное зерно» и «голубой алейрон», с белозерной пшеницей семена в F_1 будут окрашенными в красный и голубой цвет соответственно (Zeven, 1991; McIntosh et al., 2008, 2013).

Наиболее хорошо изучен генетический контроль признака «красное зерно» («red grain»). Красная окраска контролируется генами *R*, локализованными в третьей гомеологической группе хромосом пшеницы. Присутствие генов *R* в доминантной форме связано с устойчивостью зерна к прорастанию на корню (Freed et al., 1976). К настоящему моменту данные гены не только картированы, но и отсекуены (Flintham and Gale, 1995; Himi and Noda, 2005).

Первоначально у сортов пшеницы были выявлены гены *R1* в хромосоме 3D, *R2* в хромосоме 3A и *R3* в хромосоме 3B (Sears, 1954; Allan and Vogel, 1965; Metzger and Silbaugh, 1970). Затем гены *R* были картированы в дистальных районах длинных плеч хромосом третьей гомеологической группы вблизи RFLP-локуса *Xbcd131* (Gale et al., 1995; Flintham and Gale, 1995) и были переименованы в *R-A1* (бывший *R2*), *R-B1* (*R3*) и *R-D1* (*R1*) согласно правилам обозначения гомеологических генов пшеницы (McIntosh et al., 1998). При использовании изогенных линий с красной окраской зерна (Коваль и др., 1997) было установлено, что гены *R* кодируют MYB-подобные белковые факторы, регулирующие транскрипцию структурных генов,

которые кодируют ключевые ферменты биосинтеза флавоноидов (Himi et al., 2005, 2011; Himi, Noda, 2005). Описаны структурные изменения генов *R*, определяющие их рецессивное состояние (Himi et al., 2005, 2011).

Признак «голубой алейрон» контролируется генами *Va*, привнесенными в геном пшеницы мягкой от дикорастущих сородичей за счет транслокаций в хромосомах четвертой гомеологической группы хромосом. В частности, источниками генов *Va* являются дикие виды *Aegilops ovata* L., *Triticum boeoticum* Boiss., *T. monococcum* L., *T. dicoccoides* Schweinf., *Agropyron tricholporum* K. Richt. и *Agropyron glaucum* Roem. & Schult. и наиболее часто - *Agropyron elongatum* Host. (Zeven A.C, 1991; Dubcovsky et al., 1996). Cermeno и Zeller (1988), предположили, что голубозерные сорта пшеницы Blaukorn Berlin, Blaukorn Tschermak, Blaukorn Probs dorf являлись замещенными линиями, у которых пара хромосом 4A^a от *T. aestivum* замещена парой хромосом 4A^{bo} от *T. boeoticum* или *T. monococcum*. При изучении методами GISH и FISH транслокационных линий *T. aestivum* - *Ag. elongatum* (полученных от сорта Blue 58), различающихся по признаку «голубой алейрон», было выявлено, что ген, контролирующий голубую окраску зерна, локализован в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4Ag, которая замещает хромосому 4D сорта Blue 58 (Zheng et al., 2006). С помощью микросателлитного генотипирования, GISH-анализа и дифференциального С-окрашивания был идентифицирован хромосомный состав изогенной линии i:S29*Va* сорта *T. aestivum* Саратовская 29. Было показано, что при создании данной линии произошло замещение 4В хромосомы на хромосому пырея 4Ag, несущую ген голубой окраски зерна (Арбузова и др., 2012). Гены *Va* пока еще не отсекужены.

Признак «фиолетовый перикарп» контролируется двумя комплементарными доминантными генами. Впервые о роли двух комплементарных генов в формировании данного признака сообщили McIntosh и Baker (1967), затем Bolton (1970) и другие авторы, однако хромосомная локализация данных генов долгое время оставалась спорной

(McIntosh et al., 1998). К настоящему времени с помощью генетического картирования установлено, что один из генов, *Pp3*, локализован в проксимальном районе длинного плеча хромосомы 2A как твердой (Khlestkina et al., 2010a), так и мягкой (Dobrovolskaya et al., 2006) пшеницы. Другой ген, *Pp-1*, локализован в проксимальном районе короткого плеча хромосомы 7B твердой (Khlestkina et al., 2010b) и 7D мягкой (Tereshchenko et al., 2012) пшеницы.

Высказывались предположения, что признак «фиолетовый перикарп» возник у твердой пшеницы и был унаследован от нее мягкой пшеницей. Последние данные показывают справедливость этих предположений в отношении гена *Pp3*, но не *Pp-1*, который, как теперь известно, унаследован от донора D-генома, диплоидного вида *Aegilops tauschii* (Tereshchenko et al., 2012). Ген *Pp-1* еще не секвенирован, тогда как для *Pp3* выделен ген-функциональный кандидат, кодирующий MYC-подобный фактор транскрипции (Khlestkina et al., 2013a). Было показано, что одновременное присутствие доминантных генов *Pp-1* и *Pp3* предопределяет активность структурных генов биосинтеза антоцианов в перикарпе пшеницы (Tereshchenko et al., 2013). Однако функциональная роль каждого из этих двух генов пока еще не установлена.

Помимо генетической составляющей существенное влияние на пигментацию зерна оказывают факторы окружающей среды, такие как освещение, температура, увлажнение и состав почвы (Li et al., 2003; Rechman et al., 2009; Islam, 2010). Однако и генетическая составляющая не исчерпывается описанными выше генами, выявленными на основе качественных различий, наблюдаемых на уровне фенотипа. Как показывают молекулярно-генетические и геномные исследования последних лет, в биосинтез флавоноидных пигментов вовлечен целый комплекс регуляторных и структурных генов, описанию которых посвящена следующая глава.

1.2. Комплекс ферментов и генов, вовлеченных в биосинтез флавоноидных пигментов у растений

Флавоноиды представляют собой обширный класс природных биологически активных соединений с низким молекулярным весом, в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из $C_6-C_3-C_6$ – углеродных единиц (рис. 2). Развитие аналитических методов позволило провести детальный анализ качественного и количественного состава различных флавоноидов, а также выявить новые соединения флавоноидов. Были описаны более 6000 природных флавоноидов, многие из которых широко распространены среди высших растений (Harborne and Williams, 2000).

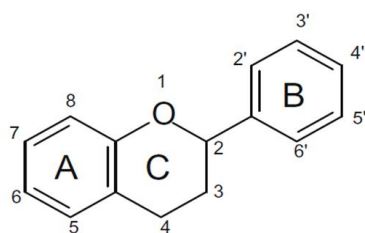


Рис. 2. Базовая структура флавоноидных соединений

Из 12 основных классов флавоноидов восемь (флавоны, флавонолы, ауруны, халконы, флаван-4-олы, катехины, лейкоантоцианидины, проантоцианидины) являются или пигментами, или предшественниками других флавоноидных пигментов. Желтой и/или оранжевой окраской обладают флавоны, гликозиды флавонолов, ауруны и халконы. Красно-коричневые пигменты – флобафены (производные флаван-4-олов) и проантоцианидины (производные катехинов и лейкоантоцианидинов). Широкую гамму пигментов: от розового до красного, синего и фиолетового, - обеспечивают антоцианидины и их производные - антоцианы (Запрометов, 1974; Бриттон, 1986; Winkel-Shirley, 2001). Некоторые бесцветные соединения, например, флавонолы, образуют комплексы с окрашенными соединениями путем копигментации и тем самым усиливают и изменяют их окраску (Бриттон, 1986).

Флавоноиды синтезируются с помощью согласованного поочередного действия свыше двадцати ферментов фенилпропаноидного пути (Winkel-Shirley, 2001, 2002; Winkel, 2008). Биосинтез флавоноидных соединений у высших растений консервативен и осуществляется в три основных этапа: образование основного C₆-C₃-C₆-скелета; образование различных классов и их взаимопревращения; конечные модификации. Образование основного C₆-C₃-C₆-скелета начинается с фенилаланина и завершается образованием халконов, которые являются предшественниками всех флавоноидных соединений. В этом процессе последовательно участвуют структурные гены *Pal*, *C4h*, *4Cl* и *Chs*, кодирующие ферменты фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат 4-гидроксилазу (C4H), 4-кумарат-КоА лигазу (4CL) и халконсинтазу (CHS), соответственно (Jende-Strid, 1993) (рис. 3).

На следующем этапе основной путь биосинтеза флавоноидов расходится на несколько боковых ветвей, каждая из которых приводит к образованию определенного класса флавоноидов (по Winkel-Shirley, 2001, 2002; Winkel, 2008). На рисунке 3 приведена детальная схема поэтапного превращения халконов в флавоноидные пигменты антоцианы и проантоцианидины.

В превращении халконов в флаваноны участвует ген *Chi*, кодирующий фермент халконфлаванонизомеразу (CHI). Из флаванонов при участии гена *F3h*, кодирующего флаванон-3-гидроксилазу (F3H), образуются дигидрофлавонолы. В образовании различных модификаций дигидрофлавонолов участвуют также гены *F3'h* (кодирует флавоноид-3'-гидроксилазу, F3'H) и *F3'5'h* (кодирует флавоноид-3'5'-гидроксилазы, F3'5'H). Далее при участии гена *Dfr*, кодирующего дигидрофлавонол-4-редуктазу (DFR), происходит восстановление дигидрофлавонолов до образования лейкоантоцианидинов, которые, в свою очередь, преобразуются в антоцианидины (предшественники антоцианов) или флаван-3-олы (предшественники проантоцианидинов).

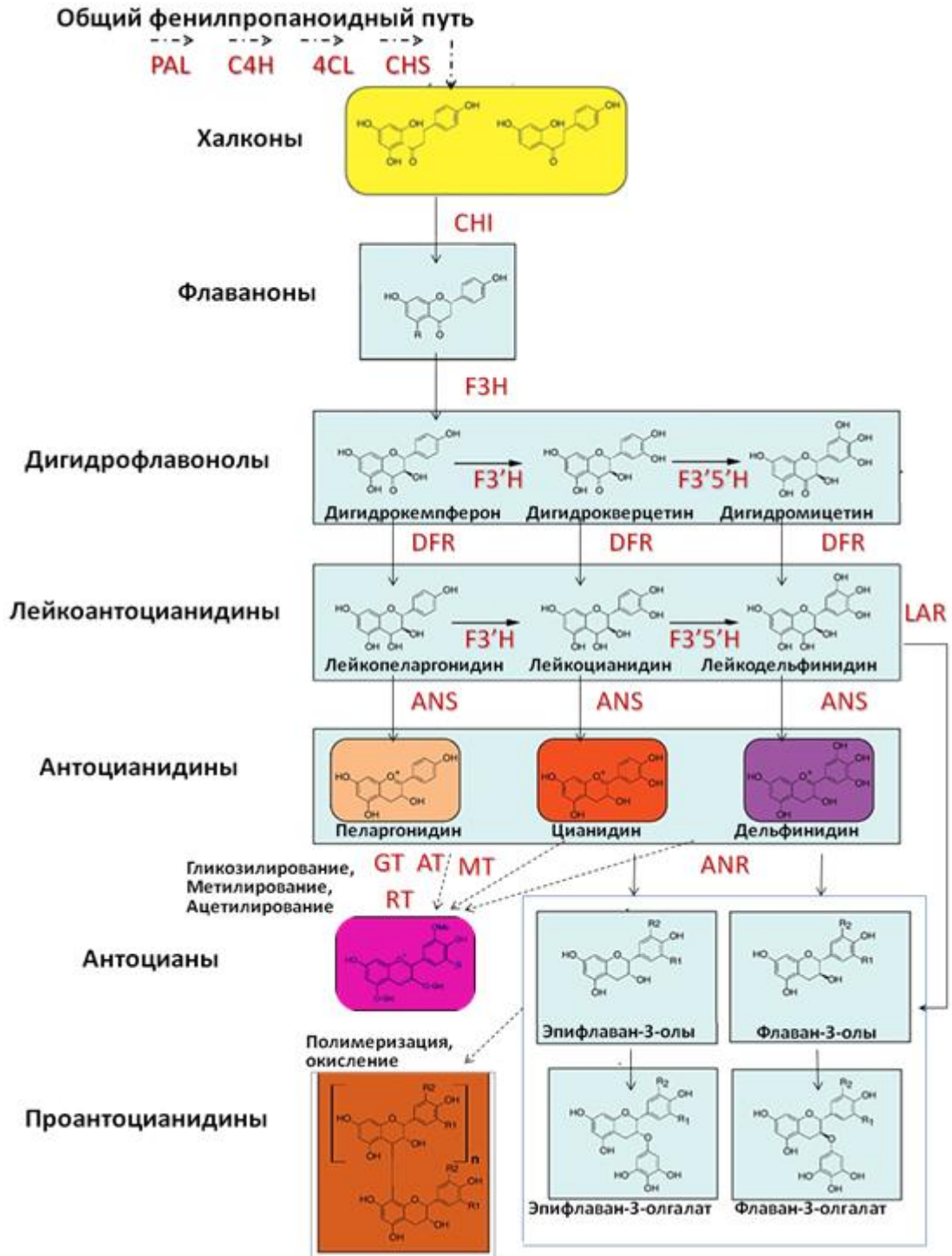


Рис. 3. Схема биосинтеза флавоноидных пигментов антоцианов и проантоцианидинов (по Dixon et al., 2013).

Преобразование лейкоантоцианидинов в антоцианидины осуществляется при участии гена *Ans*, кодирующего антоцианидинсинтазу (ANS). Флаван-3-олы образуются либо из лейкоантоцианидинов с помощью гена *Lar*, кодирующего лейкоантоцианидинредуктазу (LAR), либо из антоцианидинов при участии гена *Anr*, кодирующего антоцианидинредуктазу (ANR) (рис. 3; Запрометов, 1974; Holton and Cornish, 1995; Harborne and Williams, 2000).

Все последующие реакции биосинтеза флавоноидов относятся к реакциям конечных модификаций - метилирования, гликозилирования, ацетилирования, рамнозилирования, при участии генов *Mt*, *Gt*, *At* и *Rt*, кодирующих ферменты метилтрансферазы (MT), гликозилтрансферазы (GT), ацетилтрансферазы (AT) и рамнозилтрансферазы (RT). Именно таким путем из антоцианидинов образуются антоцианы (рис. 3).

Гены, кодирующие ферменты, которые непосредственно участвуют в биосинтезе флавоноидных соединений, объединяют в общую группу, называемую структурными генами биосинтеза флавоноидов. Структурные гены биосинтеза антоцианов разделяют на 2 группы: ранние гены биосинтеза (РГБ), которые включают *Pal*, *Chs*, *Chi*, *F3h* и поздние гены биосинтеза (ПГБ), которые включают *Dfr*, *Ans*, *Gt* (Martin et al., 1991; Kubasek et al., 1992; Quattrocchio et al., 1993; Nesi et al., 2000). Помимо структурных генов в биосинтезе участвуют регуляторные гены, контролирующие тканеспецифичную экспрессию структурных генов (Jaakola et al., 2002; Winkel-Shirley, 2001).

У многих видов растений описаны мутантные линии с нарушениями пигментации, связанными с различными повреждениями генов биосинтеза флавоноидов. Наличие таких мутантных линий позволило выделить нуклеотидные последовательности структурных и регуляторных генов биосинтеза, например, у кукурузы (Dooner et al., 1991), арабидопсиса (Koornneef, 1990; Kubo et al., 1999; Shirley et al., 1992, 1995), ячменя (Jende-Strid, 1993).

Благодаря детальному анализу выделенных последовательностей, было установлено, что в регуляции биосинтеза антоцианов принимают участие две большие группы регуляторных факторов, относящихся к группам - MYB- и MYC-подобных белков растений (табл. 2). Причем среди них есть как активаторы, так и репрессоры транскрипции структурных генов (Nehri et al., 2011). Также сравнительно недавно было показано участие еще одной группы белков в регуляции биосинтеза антоцианов – это регуляторные факторы WD40 (de Vetten et al., 1997).

Первые MYB-подобные факторы транскрипции, регулирующие биосинтез антоцианов были открыты в 1987 году у кукурузы. К ним относятся *C1* (Colorless1), *P1* (Purple 1) и *P11* (Purple leaf 1; Paz-Ares et al, 1987; Chandler et al, 1989; Goff et al, 1990; Petroni et al, 2000). Выделяют четыре класса MYB-подобных факторов транскрипции – 1R (или MYB-родственные), 2R (R2R3-MYB), 3R (R1R2R3-MYB) и 4R (смешанные). Показано, что в биосинтезе антоцианов участвуют R2R3-MYB факторы (Stracke et al., 2001). У растений в геноме присутствует около двухсот различных MYB-подобных генов (Dubos et al., 2010; Quattrocchio et al., 2008). В биосинтезе антоцианов участвуют R2R3-MYB факторы, к которым относятся регуляторные белки *C1*, *P1* и *P11* кукурузы. На основании гомологии с генами *C1*, *P1* и *P11* кукурузы были выделены члены данного семейства генов из геномов других видов растений (табл. 2).

Другая большая группа регуляторных факторов, контролирующих биосинтез антоцианов, относится к MYC-подобным белкам, которые принадлежат группе регуляторных факторов с bHLH доменом (основным спираль-петля-спираль доменом), распознающим ДНК. Первые MYC-подобные факторы транскрипции, участвующие в биосинтезе антоцианов, были открыты в 1989 году у кукурузы и представляют собой члены В/R семейства. Позже на основании гомологии с генами *В* и *Р* были выделены еще несколько членов данного семейства генов из генома кукурузы, а также гомологичные гены других видов растений (табл. 2).

Таблица 2. Типы регуляторных факторов, участвующие в биосинтезе антоцианов у разных видов растений.

Тип регуляторных факторов	MYC (bHLH)		MYB		WD40	
Роль фактора в регуляции биосинтеза	Определение тканеспецифичности биосинтеза антоцианов (Taylor and Briggs, 1990; Hartmann et al., 2005; Procissi et al., 1997; Cone et al., 19936)		Светозависимая регуляция биосинтеза (Taylor and Briggs, 1990; Hartmann et al., 2005; Procissi et al., 1997; Stushnoff et al., 2010)		Стабилизация комплекса MYB-bHLH (de Vetten et al., 1997)	
Структурный элемент и его функциональное значение	N-конец а.о.1-200	Взаимодействие с MYB (Goff et al., 1992; Ferré-d'Amaré et al., 1994)	N-конец а.о.1-52 повторы R2R3	Связывание ДНК и димеризация (Romero et al., 1998; Jin and Martin, 1999)	N-конец Повтор GH	Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker and Ludwig, 2003)
	N-конец а.о. 201-400	Взаимодействие с WD40 и/или комплексом RNApolIII (Ferré-d'Amaré et al., 1994)				
	bHLH-домен	Связывание ДНК и димеризация (Heim et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2003)	C-конец	Регуляция экспрессии гена-мишени (Stracke et al., 2001; Czempl et al., 2009)	C-конец Повтор WD	Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker and Ludwig, 2003)
	C-конец	Димеризация (Payne et al., 2000)				
Вид	Гены, кодирующие данные факторы у разных видов растений					
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heinh.	<i>TT8</i> (Nesi et al., 2000) <i>GL3/EGL3</i> (Bernhardt et al., 2003; Heim et al., 2003; Zhang et al., 2003)		<i>TT2</i> , <i>CPC</i> (Borevitz et al., 2000; Gonzalez et al., 2008) <i>MYBL2</i> (Dubos et al., 2008; Matsui et al., 2008)		<i>TTG1</i> (Walker et al., 1999)	
<i>Petunia hybrida</i> L.	<i>AN1</i> , <i>JAF13</i> (Llyod et al., 1992; Quattrocchio et al., 1998; Spelt et al., 2000, 2002)		<i>AN2</i> , <i>AN4</i> (Quattrocchio et al., 1999, 2006)		<i>AN11</i> (de Vetten et al., 1997)	
<i>Antirrhinum majus</i> L.	<i>Delila</i> (Gong et al., 1999)		<i>Rosea1</i> , <i>Rosea2</i> , <i>Venosa</i> , <i>MYB308</i> , <i>MYB330</i> (Schwinn et al., 2006)		Не определен	
<i>Vitis vinifera</i> (L.) Heinh.	<i>MYC1</i> , <i>MYCA1</i> (Hichri et al., 2010; Matus et al., 2010)		<i>MYBA1</i> , <i>MYBA2</i> , <i>MYB5a</i> (Kobayashi et al., 2002; Deluc et al., 2006, 2008; Walker et al., 2007; Cutanda-Perez et al., 2009)		<i>WDR1</i> , <i>WDR2</i> (Matus et al., 2010)	
<i>Zea mays</i> L.	<i>B</i> , <i>R</i> , <i>Lc</i> , <i>Sn</i> , <i>In1</i> (Burr et al., 1996; Chandler et al., 1989; Goff et al., 1990; Consonni et al., 1993; Petroni et al., 2000)		<i>CI</i> , <i>PII</i> , <i>PI</i> (Paz-Ares et al., 1987; Chandler et al., 1989; Goff et al., 1990; Petroni et al., 2000)		<i>PAC1</i> (Selinger and Chandler, 1999)	
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Pl</i> (Hu et al., 1996, 2000; Sakamoto et al., 2001)		<i>C</i> (Reddy et al., 1998; Saitoh et al., 2004)		Не определен	
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>ANT2</i> (Cockram et al., 2010)		Не определен		Не определен	
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>TaMYC1</i> (Shoeva et al., 2014в)		<i>Mpc1</i> (Li et al., 1999)		Не определен	

Исследование данных факторов *in vitro* показало, что они способны активировать транскрипцию генов-мишеней самостоятельно, либо в комплексе с MYB-подобными факторами, что зависит от промотора гена-мишени (Mol et al., 1998).

Третья группа факторов, регулирующих биосинтез антоцианов - это WD40 белковые повторы, консервативные для животных, растений и дрожжей (табл. 2) (Smith et al., 1999). Первый представитель данной группы был описан у петунии. Ген *An11* кодирует небольшой полипептид с консервативными повторами (WD)₅₋₆ (de Vetten et al., 1997). Мутации в данном гене приводят к отсутствию пигментации. Позднее на основании гомологии были описаны регуляторные факторы у других растений.

Схема действия регуляторных факторов в биосинтезе антоцианов хорошо описана среди двудольных у модельного вида *A. thaliana*, среди однодольных у *Z. mays*. На рисунке 4 приведена схема, показывающая принципиальное различие между регуляцией биосинтеза антоцианов у двудольных (на примере *A. thaliana*) и однодольных (на примере *Z. mays*) растений. Видно, что у однодольных для активации всех генов биосинтеза антоцианов необходимо совместное действие факторов MYB, MYC и WD40. У двудольных этот комплекс необходим для активации поздних генов, в то время как для функционирования ранних генов биосинтеза антоцианов достаточно только регуляторного фактора MYB (рис. 4). Однако, как показывает сравнение регуляции биосинтеза антоцианов у разных видов растений, внутри классов тоже возможны различные варианты регуляции (Shoeva and Khlestkina, 2014б).

Помимо активаторов, найдены регуляторные факторы, негативно влияющие на уровень транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (например, факторы MYBL2, MYB4 и BHLH32 *A. thaliana*) являются не активаторами, а репрессорами биосинтеза антоцианов (Dubos, 2008).

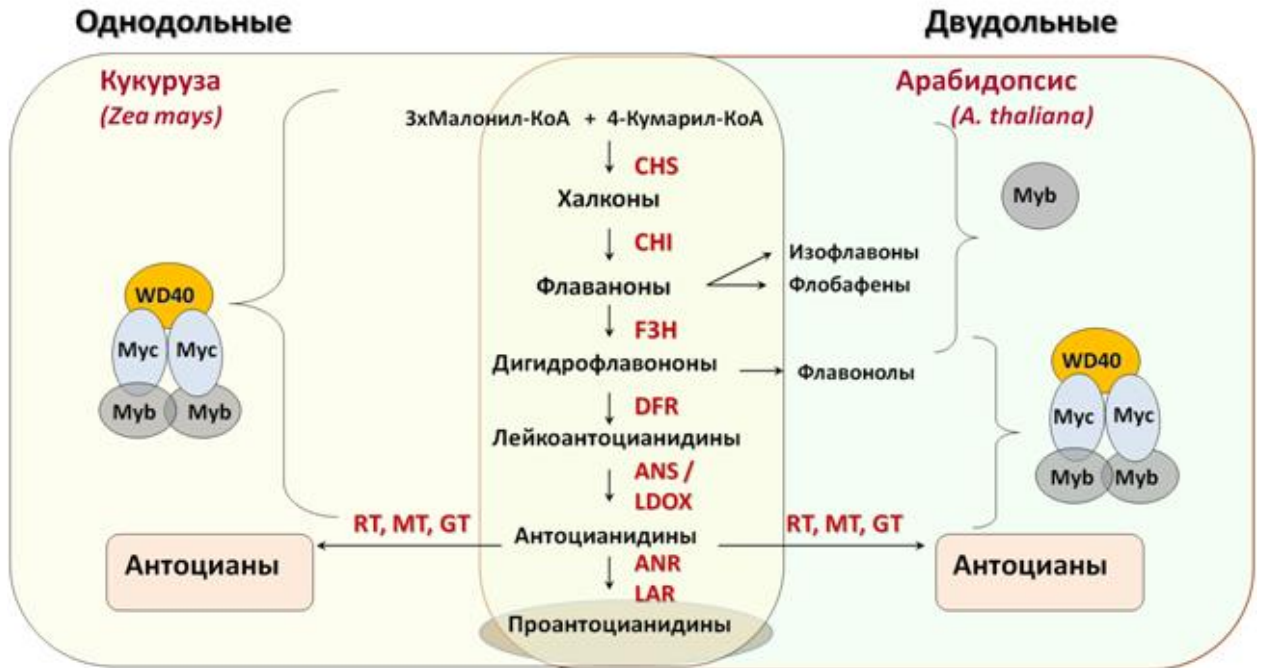


Рис. 4. Упрощенная схема биосинтеза флавоноидов и регуляция этапов биосинтеза антоцианов (по Petroni, Tonelli, 2011).

Благодаря гомологии значительных участков геномов однодольных растений стало возможным выделение и/или картирование генов биосинтеза флавоноидов пшеницы при использовании известных данных для более изученных видов (кукуруза, рис, ячмень). К настоящему моменту имеются полные или частичные данные о структуре и/или локализации девяти структурных и трех регуляторных генов биосинтеза флавоноидов (табл. 3). Для пшеницы, ввиду сложной организации ее генома, характерно наличие дублированных копий генов, что наблюдается и для генов биосинтеза флавоноидов, присутствующих в количестве от 3 до 6 копий (табл. 3).

Из числа структурных генов биосинтеза флавоноидов пшеницы наиболее полно изучены к данному моменту гены *Chi*, *F3h* и *Dfr*. Ген, кодирующий халконфлаванонизомеразу (*CHI*) присутствует в геноме мягкой пшеницы в виде трех копий *Chi-A1*, *Chi-B1* и *Chi-D1* (Li et al., 1999; Shoeva et al., 2014a). Их точное число и хромосомная локализация (5A, 5B, 5D) первоначально были установлены в работе Li с соавторами (Li et al., 1999) на основе гибридизации клона, содержащего нуклеотидную последовательность

гена *Chi* кукурузы, с фрагментами геномной ДНК нуллитетрасомных линий пшеницы сорта Chinese Spring, обработанной эндонуклеазами рестрикции.

Таблица 3. Клонированные и/или картированные к настоящему времени структурные и регуляторные гены биосинтеза флавоноидов пшеницы.

Обозначение гена	Число локусов в геноме пшеницы	Хромосомная/внутрихромосомная локализация	Полностью (или частично) отсекуенные копии
<i>Pal</i>	6	3A, 3B, 3D, 6A, 6B, 6D (Li et al., 1999)	X99705 (Liao et al., 1996; Li and Liao, 2003)
<i>Chs</i>	6	1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D (Li et al., 1999)	AY286093, AY286095, AY286096, AY286097 (Yang et al., 2004)
<i>Chi</i>	3	5A, 5B, 5D (Li et al., 1999) 5AL-7, 5BL-9, 5DL-5 (Shoeva et al., 2014a)	JN 039037, JN 039038, JN 039039 (Shoeva et al., 2014a)
<i>F3h</i>	4	2A/2AL-3, 2B/2BL-6 (2 копии), 2D/2DL-6 (Khlestkina et al., 2008b)	EF463100, DQ233636, EU402957, JN384122 (Khlestkina et al., 2008b; 2013b)
<i>F3'5'h</i>	Точное число неизвестно	-	AY519468; (Yang et al., 2004)
<i>Dfr</i> (<i>TaDfr</i>)	3	3A/3AL-3, 3B/3BL-4, 3D/3DL-1 (Himi and Noda, 2004, Munkvold et al., 2004)	AB162138, AB162139, AB162140; (Himi and Noda, 2004)
<i>Ans</i>	Не менее 5	6A (2 локуса), 6B (2 локуса), 6D (Himi et al., 2006)	AB247917, AB247918, AB247919, AB247920, AB247921 (Himi et al., 2006)
<i>Mt</i> (<i>Fmt</i>)	3	1A, 1B, 1D (Li et al., 1999)	-
<i>Rt</i>	Точное число неизвестно	5B, 5D (Khlestkina et al., 2009b)	EU815627 (Khlestkina et al. 2009b)
<i>Myc</i> (<i>TaMyc</i>)	Не менее 5	2A (2 копии), 2B, 2D (2 копии) Khlestkina et al. 2013a	KJ747954 (Shoeva et al., 2014b)
<i>Myb10</i> (<i>Tamyb10</i>)	3	3A, 3B, 3D (Himi et al., 2011a)	AB191458, AB191459, AB191460 (Himi et al., 2011a)
<i>Mpc1</i>	6	5A, 4B, 4D, 7A, 7B, 7D (Li et al., 1999)	-

Более точная локализация данных генов и выделение их полноразмерных последовательностей были осуществлены в работе Шоевой с соавторами (Shoeva et al., 2014a). Гены *Chi-A1*, *Chi-B1* и *Chi-D1* были картированы в делеционных районах длинных плеч хромосом 5A (район 5AL-7), 5B (5BL-9), 5D (5DL-5) соответственно. Было показано, что в ходе эволюции гены *Chi* пшеницы, так же как и их ортологи из трибы Triticeae,

утратили один из интронов и в результате содержат 3 экзона и 2 интрона. В промоторных областях генов *Chi-A1*, *Chi-B1* и *Chi-D1* обнаружены различные *cis*-регуляторные элементы и, в том числе, важные для регуляции биосинтеза антоцианов (MRE: MYB-опознающие элементы, RRE: R-опознающий элемент, ACE: ACGT-содержащие элементы; рис. 5).

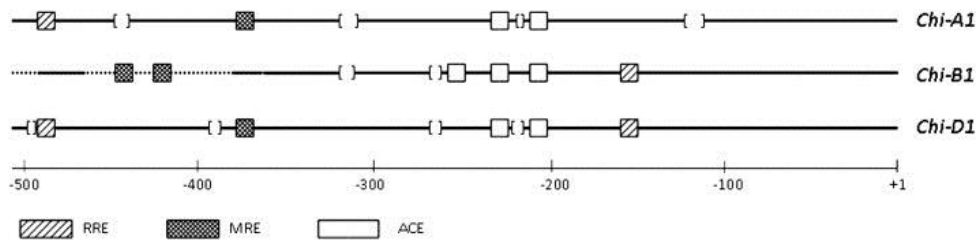


Рис. 5. Структура промоторной зоны генов *Chi* у пшеницы (Shoeva et al., 2014a). MRE: MYB-опознающие элементы, RRE: R-опознающий элемент, ACE: ACGT-содержащие элементы. Прямые линии: гомологичные регионы, пунктирные линии: негомологичные регионы, квадратные скобки: делеции.

Четыре копии гена *F3h*, кодирующего флаванон-3-гидроксилазу (F3H), были впервые идентифицированы и выделены из генома мягкой пшеницы в работе Хлесткиной с соавторами (Khlestkina et al., 2008б). Данные гены локализованы в хромосомах второй гомеологической группы в делеционных районах 2AL-3 (ген *F3h-A1*), 2BL-6 (2 копии: *F3h-B1* и *F3h-B2*) и 2DL-6 (ген *F3h-D1*). Все гены *F3h* пшеницы имеют три экзона и два интрона. Гены *F3h-A1*, *F3h-B1* и *F3h-D1* являются гомеологичными копиями, тогда как *F3h-B2* – паралог, расположенный в длинном плече хромосомы 2B на 40 сМ дистальнее копии *F3h-B1* (Khlestkina et al., 2011б). Позднее было показано, что ген *F3h-2* образовался у диплоидного общего предка трибы Triticeae, но был утрачен у большинства видов, за исключением представителей трибы, имеющих геномы В, S, G и R. Данная копия гена в ходе эволюции приобрела функциональную специализацию и экспрессируется только в корнях, участвуя, по-видимому, в биосинтезе бесцветных флавоноидных соединений, тогда как функциональная активность генов *F3h-1* связана с биосинтезом антоцианов в различных тканях наземной части растения (Khlestkina et al.,

2013б). Промоторные районы генов *F3h-1* и *F3h-2* существенно различаются. В промоторе *F3h-1* (Himi et al., 2011б; Khlestkina et al., 2013б), как и в промоторе *Chi-1* (Shoeva et al., 2014а), обнаружены *cis*-регуляторные элементы, важные для регуляции биосинтеза антоцианов.

Полноразмерные нуклеотидные последовательности трех копий гена *Dfr* мягкой пшеницы были выделены ранее других генов биосинтеза флавоноидов пшеницы (Himi and Noda, 2004). Была установлена их точная локализация в длинных плечах хромосом 3А (район 3AL-3), 3В (3BL-4) и 3D (3DL-1) пшеницы, показано наличие четырех экзонов и трех интронов в каждой из копий и присутствие в промоторах *cis*-регуляторных элементов, важных для регуляции биосинтеза флавоноидов.

Информация о структуре генов, кодирующих ферменты биосинтеза флавоноидов у пшеницы, позволила в ряде работ провести сравнительный анализ их транскрипции в различных органах изогенных линий и других генетически маркированных линий, различающихся по окраске (табл. 4).

Показано, что гомеологичные копии структурных генов биосинтеза флавоноидов, несмотря на сходство, могут иметь некоторые количественные отличия в экспрессии. Например, *Chi-B1* в некоторых органах экспрессируется слабее по сравнению с *Chi-A1* и *Chi-D1* (Shoeva et al., 2014а). Аналогичным образом, *TaDfr-A* экспрессируется в зерне пшеницы слабее по сравнению с *TaDfr-B* и *TaDfr-D* (Himi and Noda, 2004).

На основе результатов сравнительных исследований транскрипции структурных генов биосинтеза флавоноидов в различных органах линий пшеницы, маркированных доминантными/рецессивными аллелями генов, контролирующей окраску, были сделаны важные выводы о роли данных генов в регуляции транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Khlestkina et al., 2008б; Tereshchenko et al., 2013) и проантоцианидинов (Himi et al., 2005), что послужило основой для дальнейшего выделения нуклеотидных последовательностей данных регуляторных генов пшеницы.

Таблица 4. Данные по изучению транскрипции структурных генов биосинтеза флавоноидов у пшеницы

Линии (какими генами маркированы)	Часть растения, из которой выделялась РНК	Структурные гены, транскрипция которых изучалась	Вывод (ссылки)
Изогенные линии и сорта, маркированные доминантными и рецессивными аллелями генов <i>R-1</i>	Оболочка семени	<i>Chs, Chi, F3h, Dfr</i>	Гены <i>R-1</i> активируют транскрипцию структурных генов биосинтеза проантоцианидинов в оболочке семени (Himi and Noda, 2004, 2005)
Замещенные, дополненные, интрогрессивные и рекомбинантные линии, маркированные доминантными и рецессивными аллелями генов <i>Rc-1</i>	Колеоптиле	<i>Chs, Chi, F3h-1, Dfr, Ans, Ufgt, 3Rt</i>	Гены <i>Rc-1</i> активируют транскрипцию структурных генов биосинтеза антоцианов в колеоптиле (Ahmed et al., 2006; Khlestkina et al., 2008б, 2009б, 2010б)
Изогенные линии, маркированные доминантными и рецессивными аллелями генов <i>Rc-1, Pc-1, Pls-1, Plb-1, Pp-1+Pp3</i>	Колеоптиле, стебель, листовые влагалища и пластинки, перикарп, корень	<i>Chs, Chi, F3h-1, Dfr, Ans</i>	Гены <i>Rc-1, Pc-1, Pls-1, Plb-1, Pp-1+Pp3</i> активируют в соответствующих органах транскрипцию структурных генов биосинтеза антоцианов, за исключением <i>F3h-2</i> , который специфически транскрибируется в корнях (Khlestkina et al., 2013б; Tereshchenko et al., 2013; Шоева и Хлесткина, 2013; Shoeva et al., 2014а)
Изогенные и интрогрессивные линии, маркированные доминантными и рецессивными аллелями генов <i>Rg-1</i>	Колосковые чешуи	<i>Chs, F3h-1</i>	Гены <i>Rg-1</i> активируют транскрипцию структурных генов биосинтеза флавоноидов в колосковых чешуях (Khlestkina, 2010)

Среди регуляторных генов биосинтеза флавоноидов пшеницы первым был клонирован ген, контролирующий биосинтез проантоцианидинов в оболочке семени: ген *R-1*, контролирующий признак «красное зерно» (Himi et al., 2011а). Этот ген кодирует транскрипционный фактор из семейства MYB, характеризующийся наличием домена R2R3. Такая же структура характерна для известного фактора TT2 арабидопсиса, который регулирует синтез проантоцианидинов в семенной оболочке. Из генома пшеницы выделено три копии данного гена, обозначенные *Tamyb10-A1* (хромосома

3A), *Tamyb10-B1* (3B), *Tamyb10-D1* (3D), соответствующие ранее картированным гомеологичным генам *R-A1*, *R-B1* и *R-D1*. Было показано, что рецессивное аллельное состояние гена *R-A1* связано с потерей функциональности *Tamyb10-A1* или за счет делеции части домена R2R3, или за счет инсерции транспозона семейства hAT длиной 2200 п.н. Рецессивное состояние гена *R-B1* связано с делецией в гене *Tamyb10-B1* длиной 19 п.н., приводящей к сдвигу рамки считывания. Авторы разработали диагностические ПЦР-маркеры для выявления доминантных / рецессивных аллелей *R-A1*, *R-B1* и *R-D1*, что является важным для ускорения процесса селекции по признаку «красное зерно» (Himi et al., 2011a).

Недавно из генома пшеницы на основе гомологии с геномами риса и кукурузы была выделена и охарактеризована полноразмерная нуклеотидная последовательность гена *TaMyc1* – функционального кандидата для гена *Pp3*, контролирующего биосинтез антоцианов в перикарпе зерна. Установлено, что *TaMyc1* кодирует транскрипционный фактор MYC (bHLH) (Shoeva et al., 2014в). Представители семейства транскрипционных факторов MYB, необходимые для регуляции биосинтеза антоцианов, из генома пшеницы еще не выделены, но кодирующие их нуклеотидные последовательности (*Mpc1*) идентифицированы в хромосомах 5A, 4B, 4D, 7A, 7B, 7D мягкой пшеницы (Li et al., 1999). На основе сравнительного картирования предполагается, что копии *Mpc1*, локализованные в хромосомах 7A, 7B и 7D соответствуют локусам *Rc-1*, *Pp-1*, *Pc-1*, *Plb-1*, *Pls-1*, *Pan1* (см. полное название генов в списке сокращений), контролирующим антоциановую пигментацию различных органов пшеницы (Хлесткина, 2012). О выделении из генома пшеницы нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих факторы семейства WD40, пока не сообщалось.

Для выполнения флавоноидными соединениями своих функций необходимо, чтобы после биосинтеза они были перемещены в надлежащий компартмент клетки. Флавоноиды накапливаются в цитозоле и в вакуолях,

могут присутствовать в клеточных стенках и ядре клетки (Lecas and Brillouet, 1994; Mol et al., 1998; Markham, 2000; Koes et al., 2005; Yazaki, 2005; Kitamura, 2006; Gagne, 2006; Peer and Murphy, 2008).

Как было установлено на примере арабидопсиса, флавоноиды, накапливающиеся в цитозоле, регулируют движение ауксина от клетки к клетке (Buer and Muday, 2004). Флавоноиды нередко обнаруживаются в клеточных ядрах, что может указывать на их участие в регуляции транскрипции генов (Peer and Murphy, 2008). Было продемонстрировано связывание катехинов с гистоновыми белками; возможно катехины модулируют неспецифическую транскрипцию генов (Peer and Murphy, 2008). Флавоноидные соединения обнаруживаются также в плазматической мембране, где они вносят свои модификации как напрямую, изменяя текучесть мембраны или характер фосфорилирования липидов или белков, так и опосредованно, через сигнальный каскад, изменяя при этом состав мембраны (Peer and Murphy, 2008).

Результаты многочисленных экспериментов показывают, что участки, в которых флавоноиды накапливаются, часто не совпадают с местом их синтеза. Так, антоцианы и проантоцианидины синтезируются в цитозоле, а накапливаются в вакуолях. В целом биосинтез флавоноидных соединений происходит преимущественно в цитозоле. Стаффорд (Stufford, 1974) предположил, что ферменты биосинтеза флавоноидов образуют в цитозоле мультиферментные комплексы (метаболоны). Кроме того, известно, что в корнях арабидопсиса ферменты CHS и CHI колокализуются в эндоплазматическом ретикулуме и тонопластах (Saslowsky and Winkel-Shirley, 2001).

В связи с тем, что место синтеза и накопления флавоноидов не совпадает, следует предполагать наличие в растительной клетке определенных механизмов транспорта флавоноидов. На данный момент предполагается, что в вакуолярном поглощении флавоноидов участвуют несколько видов транспортеров (Petrucci, 2013). В этом процессе

задействованы протон-зависимый, протон-независимый и АТФ-зависимый механизмы. Выделен ген *ZmMRP3*, кодирующий транспортер АВС-типа, необходимый для перемещения молекул антоцианов в клетках кукурузы (Goodman et al., 2004), и ген *TT12*, кодирующий транспортер МАТЕ-типа, участвующий в перемещении молекул проантоцианидинов в клетках арабидопсиса (Debeaujon et al., 2001). Участие транспортеров МАТЕ-типа в перемещении молекул антоцианов было показано и для томатов (Mathews et al., 2003). Решающую роль в субклеточном транспорте флавоноидов играют также белки глутатион S-трансферазы (GSTs) (Mueller et al., 2000). Процесс транспортировки флавоноидных соединений лучше всего описан в плодах винограда. Гипотетическая схема данного процесса представлена на рисунке 6.

Несмотря на имеющиеся данные, общая картина механизмов субклеточной транспортировки до сих пор остается весьма разрозненной. Для пшеницы какие-либо данные о внутриклеточной локализации флавоноидов и генах, контролирующих процесс их транспортировки, и вовсе отсутствуют. Между тем, правильная субклеточная локализация данных соединений имеет решающее значение для выполнения определенных биологических функций.

Так, например, накопление предшественников проантоцианидинов в вакуолях клеток семенной оболочки, их последующая полимеризация и окисление до проантоцианидинов важно для уплотнения семенной оболочки. Это, в свою очередь, играет роль в существовании периода покоя семян, необходимого для защиты и сохранения всхожести семян до того момента, когда наступят условия, благоприятные для прорастания и роста растений (Shirley, 1998; Debeaujon et al., 2000).

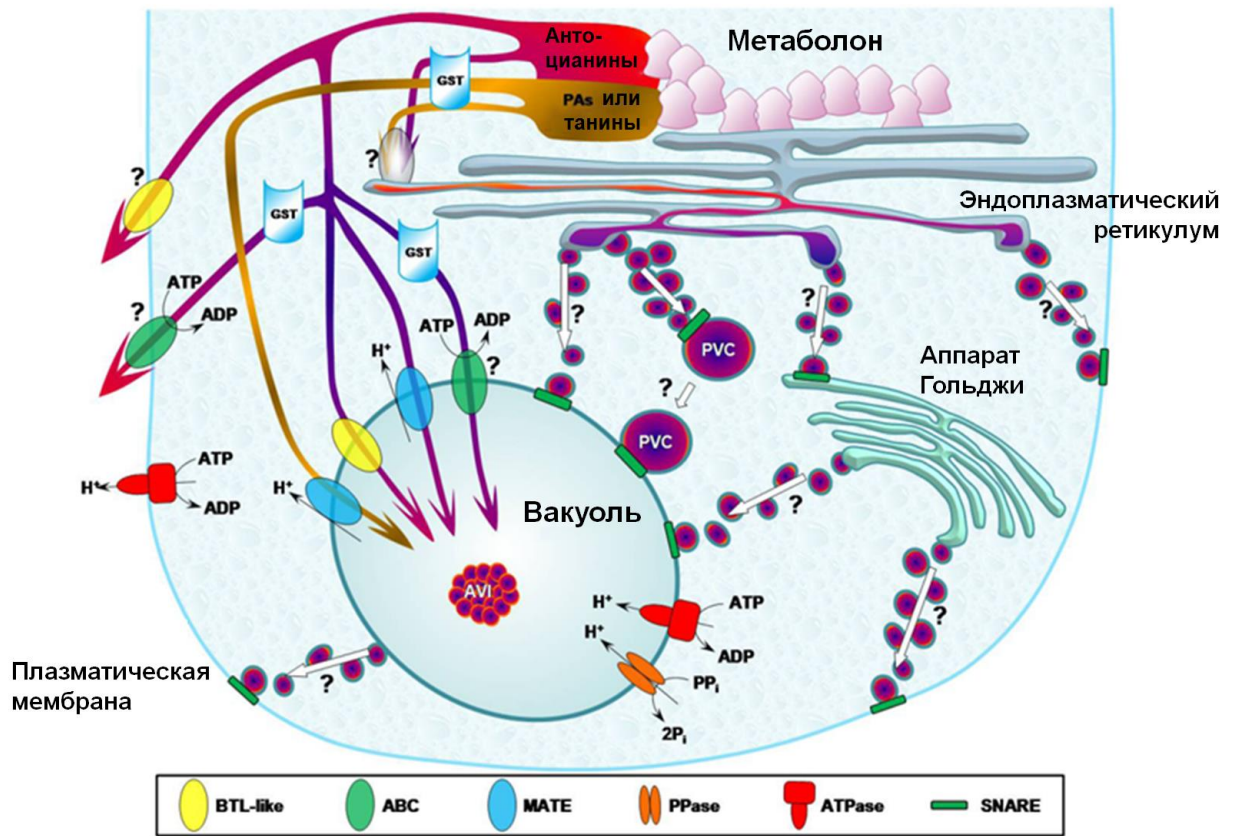


Рис. 6. Гипотетическая схема транспорта флавоноидов в клетках растений (Petrucca et al., 2013). Направление движения свободных флавоноидов и флавоноидов, связанных глутатион S-трансферазами (GSTs), показаны разными цветами для антоцианов или проантоцианидинов (PAs). Основные транспортеры, локализованные в тонопласте и плазматической мембране, представлены белками билинтранслоказами BTL; АТФ-связывающими кассетными транспортерами ABC и смешанными транспортерами типа MATE. AVI - вакуолярные включения молекул антоцианов; PVC – предшественники вакуолярных включений; SNARE – белковые рецепторы, чувствительные к N-этилмалеимиду. Вопросительные знаки указывают на отсутствие информации или гипотетические этапы процесса.

1.3. Генетические модели для исследования локализации и функциональной организации генов пшеницы и методы их создания

Аллополиплоидная структура генома пшеницы позволяет выживать растениям с различными хромосомными нарушениями и с потерей одной, иногда даже пары гомологичных хромосом (Цитогенетика пшеницы и ее гибридов, 1971). Благодаря этому свойству пшеницы, начиная с пионерских

работ Эрни Сирса (Sears, 1944 , 1946 , 1954), была создана, и в наше время продолжает пополняться, обширная коллекция цитологически маркированных линий. В их число входят линии, не имеющие либо целиком пары хромосом (нуллисомные), или одного плеча хромосомы (дителосомные линии), или фрагмента хромосомы (делеционные линии); линии, в которых пара хромосом заменена гомеологичной парой из того же сорта (нуллитетрасомные), или гомологичной парой другого сорта пшеницы (межсортовые замещенные линии), или другого вида (чужеродно-замещенные линии); линии, несущие дополнительную пару хромосом или дителосом, полученных из родственных видов (чужеродно-дополненные линии) (Цитогенетика пшеницы и ее гибридов, 1971; Khlestkina, 2014).

В настоящее время эти линии являются незаменимой моделью для анализа полиплоидного генома пшеницы, установления локализации и функциональной организации ее генов. Основные современные направления использования цитологически и генетически маркированных линий пшеницы отображены на рисунке 7.

В частности, нуллитетрасомные, дителосомные и дополненные линии широко используются для картирования хромосом с помощью ДНК-маркеров (Chao et al., 1989; Röder et al., 1995, 1998; Sourdille et al., 2004; Huang et al., 2000; Somers, 2004; Somers et al., 2004) и локализации генов (Li et al., 1999; Himi and Noda, 2004; Qi et al., 2004; Boisson et al., 2005; Nomura et al., 2005; Appleford et al., 2006; Shitsukawa et al., 2007; Khlestkina et al., 2008a).

Линии с межсортовым замещением хромосом (Law and Worland, 1996) и их производные являются удобным инструментом для генетического анализа количественных признаков (Khlestkina, 2014). Дителосомные и чужеродно-дополненные линии используются при создании хромосом-специфичных ВАС-библиотек (Doležel et al., 2012), необходимых для успешной реализации проектов полногеномного секвенирования пшеницы и ее сородичей. Также чужеродно-дополненные и замещенные линии полезны для изучения активности чужеродных генов на генетическом фоне пшеницы

(Khlestkina, 2009б, 2010в). Этот интерес связан с использованием ресурсов дикорастущих злаков для расширения генетического потенциала их культурных сородичей, в том числе пшеницы.

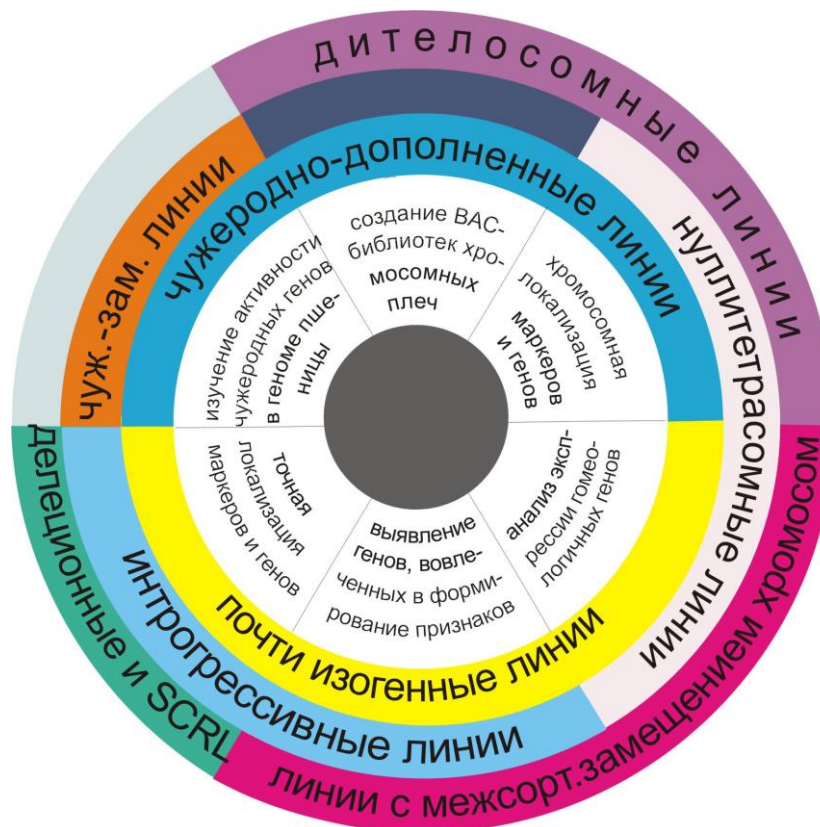


Рис. 7. Основные современные направления использования цитологически и генетически маркированных линий пшеницы (по Khlestkina, 2014; перевод с английского).

Для точной внутривхромосомной локализации и изучения функциональной роли генов, а также для выявления генов, участвующих в формировании различных признаков, незаменимым инструментом являются почти изогенные линии или интрогрессивные линии с единичными вставками. Такие линии все чаще используют в сравнительных транскриптомных, протеомных и метаболомных исследованиях (Dyck, Samborski, 1968; Carver et al., 1993; Hulbert et al., 2007; Pumphrey et al., 2007; Bolton et al., 2008; Hamzehzarghani et al., 2008; Houde and Diallo, 2008; Jia et al., 2009; Manickavelu et al., 2010; Gunnaiah et al., 2012).

Почти изогенные линии получают от скрещивания сорта-донора и сорта-реципиента, и серии последующих возвратных скрещиваний на сорт-реципиент (до 8-9 скрещиваний) с отбором по целевому признаку. Интрогрессивные линии пшеницы создают путем первоначального скрещивания сорта-реципиента мягкой пшеницы с дикорастущими видами и дальнейшей серии возвратных скрещиваний на сорт-реципиент с отбором по целевому признаку. На создание таких линий уходит до 10 лет, однако с появлением методов ДНК-генотипирования стало возможным ускоренное получение генетически-маркированных линий за счет отбора растений на ранних этапах развития с использованием ДНК-маркеров (Адолина и др., 2012; Timonova et al., 2013; Хлесткина, 2013).

ДНК-маркеры – это кодирующие или некодирующие участки генома, разные варианты (аллели) которого отличаются на уровне ДНК, т.е. являются полиморфными. Преимущество использования ДНК-маркеров заключается в том, что с их помощью, во-первых, можно легко отличить гетерозиготу от доминантной гомозиготы, а во-вторых, проводить отбор нужных растений на ранних стадиях развития еще до проявления селективируемого признака. Следовательно, можно проводить скрещивания в каждый вегетационный период и, таким образом, существенно сокращать процесс получения нового сорта/линии (Хлесткина, 2013). Особенно эффективными маркерами для селекции по какому-либо признаку будут маркеры, наиболее близко расположенные к целевому гену.

В настоящее время существует огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК и множество комбинаций данных методов. При изучении генома растений наиболее часто используются следующие подходы: RFLP, CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR, и SNP (см. подробное описание в обзорных статьях (Gupta et al. 1999; Хлесткина, Салина, 2006; Хлесткина, 2011). Однако наиболее удобными и востребованными ДНК-маркерами, используемыми в селекции пшеницы, на сегодняшний день являются SSR (simple sequence repeat – простые

повторяющиеся последовательности) или микросателлитные маркеры (Хлесткина и др., 2004; Хлесткина, Салина, 2006; Леонова, 2013). Это кодоминантные маркеры, характеризующие индивидуальные локусы в геноме пшеницы. Микросателлиты представляют собой короткие повторы ДНК длиной 1-6 нуклеотидов. Эти повторы возникают главным образом из-за ошибок ДНК-полимеразы, которые приводят к вставкам или делециям повторяющихся единиц. Основными их преимуществами являются: множественный аллелизм, специфичность к определенной хромосоме и равномерное распределение по всем хромосомам генома данного вида. К настоящему моменту определена точная хромосомная локализация нескольких тысяч микросателлитных маркеров, равномерно распределенных по геному пшеницы (Röder et al., 1998; Sourdille et al. 2004; Ganal, Röder, 2007).

Анализ SSR-маркеров основан на использовании доступных и недорогих методов лабораторного исследования: полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофоретическом разделении полученных фрагментов ПЦР. Этот метод может быть частично автоматизирован за счет использования более дорогого метода анализа - разделения флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов в капиллярном секвенаторе. ДНК-маркеры, в том числе SSR-маркеры, широко используют в своей работе селекционеры США, Европейского Союза, Австралии, Японии, Китая и других стран (Беспалова, 2012). Серия исследований линий *T. aestivum*-*T. timopheevii* (Леонова и др., 2002, 2008; Leonova et al., 2008; Гордеева и др., 2009) с применением цитологических и ДНК-маркеров, в том числе SSR-маркеров, стала основой для дальнейшего быстрого и успешного развития линий мягкой пшеницы, устойчивой к бурой ржавчине, содержащих одну или несколько интрогрессий от *T. timopheevii* (Timonova et al., 2013). Эти линии используются в селекционной программе в качестве промежуточных форм для переноса генов устойчивости от *T. timopheevii* в мягкую пшеницу.

SSR-маркеры применяются не только в селекции, но, в первую очередь, для картирования генов, а также в популяционно-генетических исследованиях для паспортизации сортов (Малышев и др., 2006; Хлесткина, Салина, 2006).

Таким образом, SSR-маркеры могут быть рекомендованы для ускоренного получения как новых сортов, так и новых генетических моделей, в частности, генетически маркированных линий пшеницы.

Как уже было сказано выше, интерес к чистым генетическим линиям пшеницы, создаваемым в течение многих лет с целью локализации генов и интродукции новых генов в мягкую пшеницу, возродился в контексте молекулярной и функциональной генетики. Так, использование изогенных линий пшеницы, ранее созданных в ИЦиГ СО РАН (Коваль, 1997; Arbuzova et al., 1998), позволило изучить функциональную роль некоторых генов, контролирующих пигментацию. С помощью изогенных, а также интрогрессивных линий установлено, например, что гены *Rg*, контролирующие окраску колоса, определяют активность в колосковых чешуях гена *Chi*, но не влияют на экспрессию *F3h*, что привело к выводу о регуляции данными генами флобафеновой ветви биосинтеза (Khlestkina, 2010).

С помощью изогенных линий (Arbuzova et al., 1998) было показано, что гены, контролирующие антоциановую пигментацию различных органов пшеницы, вероятно, кодируют транскрипционные факторы, необходимые для активации структурных генов биосинтеза антоцианов в соответствующих органах (Tereshchenko et al., 2013). Аналогичный вывод был сделан для генов *R-1* в отношении структурных генов биосинтеза проантоцианидинов (Himi et al., 2005) с использованием изогенных линий, полученных С.Ф. Ковалем (Коваль, 1997).

Заключение к Главе 1

У пшеницы различия по окраске зерна обусловлены накоплением определенных флавоноидных пигментов в разных слоях зерновки. В частности, фиолетовая окраска связана с синтезом и накоплением антоцианов в перикарпе. Повышенный интерес к зерновым злакам, характеризующимся антоциановой окраской семени, в том числе к пшенице, связан с их потенциальным использованием в качестве дополнительных источников антиоксидантных соединений, употребляемых в пищу и необходимых для здоровья человека. В связи с этим актуальным является получение новых знаний о механизмах генетической регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе, призванное сделать в дальнейшем более эффективным процесс селекции пшеницы по данному признаку.

До настоящей работы было установлено, что проявление фиолетовой окраски перикарпа у пшеницы определяется наличием двух комплементарных доминантных генов: *Pp-D1* (в хромосоме 7D) и *Pp3* (в хромосоме 2A), - одновременное присутствие которых в геноме пшеницы влияет на повышение транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов в перикарпе. Однако оставалось неясным, какую функцию на молекулярном уровне выполняет каждый из генов *Pp* по отдельности, также оставались невыделенными некоторые гомеологичные копии генов *Pp*, и отсутствовали генетически маркированные линии, необходимые для сравнительных исследований, направленных на решение данных задач.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

При создании изогенных линий рекуррентным родителем служил яровой сорт мягкой пшеницы *T. aestivum* Саратовская 29 (C29/S29). Донором рецессивного аллеля *pp-A1* исходно являлся сорт *T. aestivum* Yanetzki's Probat (YP). В настоящей работе в качестве донора *pp-A1* использовалась линия S29/YP 140, выбранная из серии рекомбинантных линий, полученных ранее; ее геном идентичен C29 за исключением короткого фрагмента от YP в хромосоме 7A (Khlestkina et al., 2010b). Донорами доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* исходно служили сорта *T. aestivum* Purple и Purple Feed (Arbuzova et al., 1998). В настоящей работе были использованы их производные: линии $i:S29Pp1Pp2^{PF}$ и $i:S29Pp1Pp3^P$, в которых локализация вставок от Purple и Purple Feed в хромосомах 2A и 7D была ранее установлена Терещенко с соавторами (Tereshchenko et al., 2012).

В первой серии скрещиваний было произведено беккроссирование каждой из линий $i:S29Pp1Pp2^{PF}$ ($i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$) и $i:S29Pp1Pp3^P$ ($i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P$) родительской формой Саратовская 29. На втором этапе полученные линии $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ и $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P$ были взяты для скрещивания с линией S29/YP 140 ($i:S29pp-A1pp-D1pp3$). Схема скрещиваний на примере $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$ приведена на рисунке 8.

Генотипы используемых в работе изогенных линий пшеницы, в том числе линий, полученных в настоящей работе, описаны в таблице 5. Данные линии использовались для оценки содержания антоцианов и анализа экспрессии генов биосинтеза антоцианов в перикарпе.

Характеристика F_2 популяций пшеницы, используемых в работе для проведения тестов на аллелизм между линиями и сортами, имеющими окраску колеоптиле, дана в таблице 6.

Таблица 5. Набор изогенных линий пшеницы с разными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp*. Д – доминантные, Р – рецессивные аллели генов *Pp*.

Обозначение (предыдущее/ альтернативное название)	<i>Pp-A1</i> (7A)	<i>Pp-D1</i> (7D)	<i>Pp3</i> (2A)	Антоциановая пигментация перикарпа	Антоциановая пигментация колеоптиле (доминантные гены)	Ссылки
*i:S29 <i>Pp-A1Pp-D1Pp3</i> ^{PF} (i:S29 <i>Pp1Pp2</i> ^{PF})	Д	Д	Д	интенсивная	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)	Arbuzova et al., 1998; Tereshchenko et al., 2012a
*i:S29 <i>Pp-A1pp-D1Pp3</i> ^{PF}	Д	Р	Д	слабая	слабая (<i>Rc-A1</i>)	настоящее исследование
*i:S29 <i>Pp-A1Pp-D1pp3</i> ^{PF}	Д	Д	Р	отсутствует	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)	настоящее исследование
i:S29 <i>pp-A1pp-D1Pp3</i> ^{PF}	Р	Р	Д	отсутствует	отсутствует	настоящее исследование
*i:S29 <i>Pp-A1pp-D1pp3</i> (Саратовская 29)	Д	Р	Р	отсутствует	слабая (<i>Rc-A1</i>)	<i>Pp-A1</i> описан в наст. исследовании
*i:S29 <i>pp-A1pp-D1pp3</i> (S29/YP 140)	Р	Р	Р	отсутствует	отсутствует	Khlestkina et al., 2010b, настоящее исследование
*i:S29 <i>Pp-A1Pp-D1Pp3</i> ^P (i:S29 <i>Pp1Pp3</i> ^P)	Д	Д	Д	интенсивная	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)	Arbuzova et al., 1998; Tereshchenko et al., 2012a
*i:S29 <i>Pp-A1pp-D1Pp3</i> ^P	Д	Р	Д	слабая	слабая (<i>Rc-A1</i>)	настоящее исследование
*i:S29 <i>Pp-A1Pp-D1pp3</i> ^P	Д	Д	Р	отсутствует	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)	настоящее исследование
i:S29 <i>pp-A1pp-D1Pp3</i> ^P	Р	Р	Д	отсутствует	отсутствует	настоящее исследование

* - отмечены линии, используемые для анализа экспрессии генов биосинтеза антоцианов в перикарпе.

«Р» – источник доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* сорт Purple

«PF» - источник доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* сорт Purple Feed

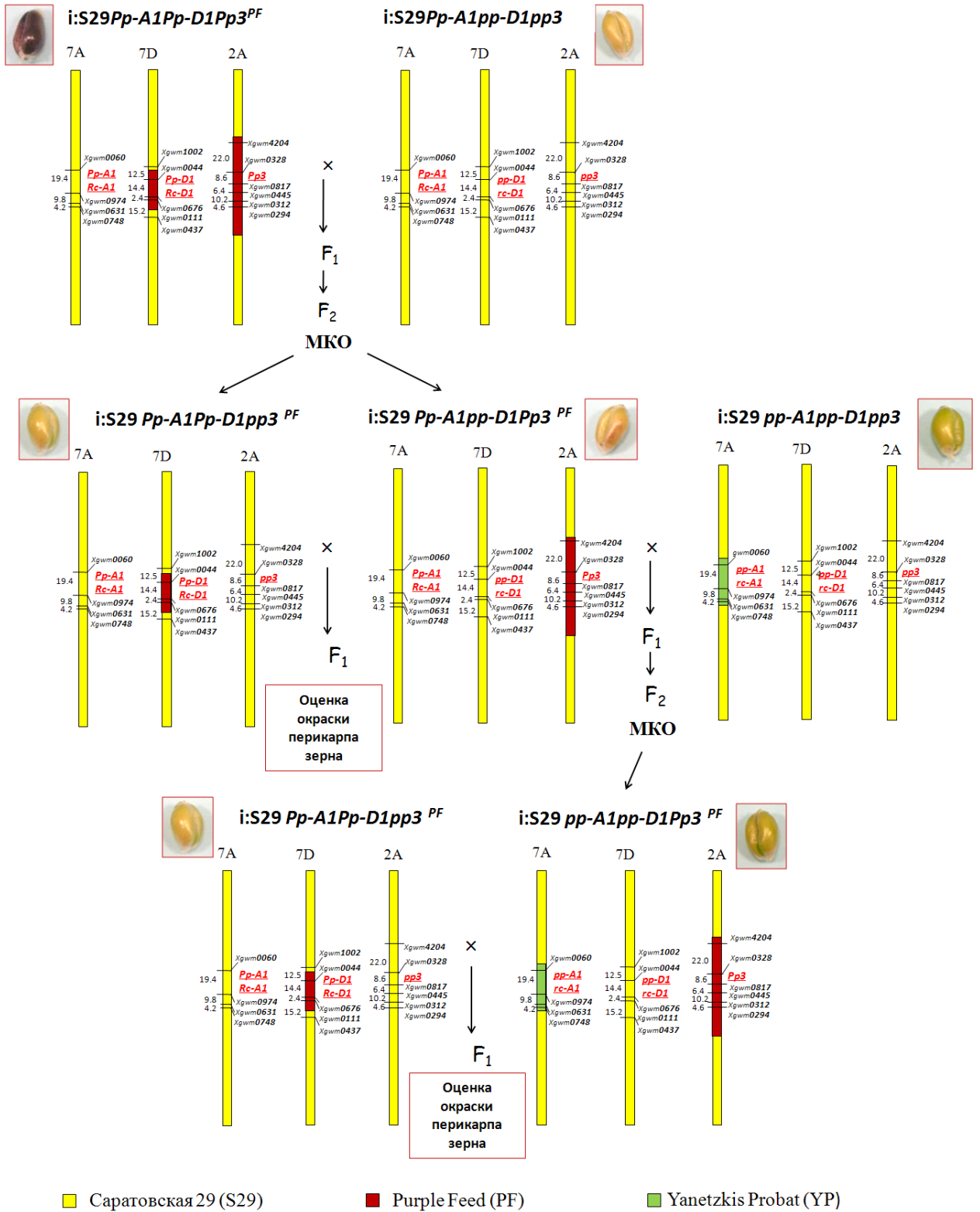


Рис. 8. Схема получения изогенных линий, содержащих различные комбинации рецессивных и доминантных аллелей генов *Pp*. MKO – маркер-контролируемый отбор.

Для проверки возможности использования вновь созданных линий в качестве тестерных на присутствие доминантных аллелей генов *Pp* использовалась линия с неизвестным аллельным состоянием генов *Pp*, *i:S29Ra*, полученная ранее (Arbuzova et al., 1998) отбором по признаку окраски ушек листового влагалища.

Таблица 6. Характеристика используемых в работе F₂ популяций *T. aestivum*.

Назначение	Оцениваемый признак	Родитель 1	Родитель 2	*Размер популяции	Популяция создана
Тест на аллелизм, анализ сцепления	Окраска колеоптиле и перикарпа	Purple (темно-красное колеоптиле и фиолетовый перикарп)	Саратовская 29 (светло-красное колеоптиле и неокрашенный перикарп)	127	Dobrovolskaya et al., 2006
Тест на аллелизм	Окраска колеоптиле	Purple (темно-красное колеоптиле)	Новосибирская 67 (темно-красное колеоптиле)	128	
Тест на аллелизм	Окраска колеоптиле	Purple Feed (темно-красное колеоптиле)	Саратовская 29 (светло-красное колеоптиле)	129	
Тест на аллелизм	Окраска колеоптиле	Purple Feed (темно-красное колеоптиле)	Новосибирская 67 (темно-красное колеоптиле)	122	
Тест на аллелизм	Окраска колеоптиле	изогенная линия <i>i:S29Ra</i> (темно-красное колеоптиле)	Новосибирская 67 (темно-красное колеоптиле)	164	в настоящей работе

*Окраску колеоптиле определяли в F₂ и дополнительно проверяли по фенотипу 10 растений из F₃ семейства от каждого F₂.

2.2. Методы

2.2.1. Фенотипирование растений

Растения выращивались в парнике и в гидропонной теплице центра коллективного пользования лаборатории искусственного выращивания растений ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/en/institute/structure.html>). Окраску перикарпа зерна оценивали визуально во время созревания семян и/или после сбора урожая. Окраска колеоптиле оценивалась согласно методу, описанному ранее (Khlestkina et al., 2011a). Зерна высевали для прорастания в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в условиях переменного

освещения (12 часов на свету/ 12 часов в темноте) и при постоянной температуре +20°C в климатической камере «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH). Визуальную оценку цвета колеоптиле проводили на 4-й день после прорастания. В случае использования окраски колеоптиле в качестве дополнительного маркера для отбора аллелей *Pp-A1* и *Pp-D1* высевали по 40 зерен от каждого растения F₁.

2.2.2. Генотипирование

2.2.2.1. Микросателлитные маркеры

Принадлежность генетического материала в хромосомах 2A, 7A и 7D к тому или иному родительскому сорту устанавливали с помощью полиморфных микросателлитных маркеров. Праймеры к геномным микросателлитным маркерам GWM (Gatersleben Wheat Markers) (Röder et al., 1998; Ganal, Röder, 2007), локализованным на хромосомах 2A, 7A и 7D, были синтезированы в ООО «Биоссет» (Новосибирск) или (отдельные праймеры) любезно предоставлены д-р М.С. Рёдер (IPK-Gatersleben, Германия).

Перечень основных маркеров, используемых в работе, отобранных после предварительной оценки, дан в таблице 7. Предварительная оценка осуществлялась путем анализа в 5% агарозном геле исходных маркеров, рекомендуемых в работах Tereshchenko et al. (2012) и Khlestkina et al. (2010б). Для анализа растений в настоящей работе были выбраны только те маркеры, которые четко определяют отличия между C29/Purple, C29/Purple Feed, C29/YP путем анализа в 5% агарозном геле (табл. 7). Данные маркеры были использованы для отбора и получения новых линий с единичными доминантными аллелями генов *Pp*.

Кроме того, для генотипирования популяции C29 × Purple (табл. 6) использовались маркеры *Xgwm0328*, *Xgwm0817*, *Xgwm0445*, *Xgwm0044*, *Xgwm0676*, *Xgwm0437*, рекомендованные в работах: Dobrovolskaya et al. (2006) и Khlestkina et al. (2010а).

Таблица 7. Микросателлитные “GWM” маркеры, используемые в настоящей работе.

Маркер	Локализация	t° отжига	Размеры продуктов ПЦР, сцепленных с Pp			
			S29	P	PF	YP
Xgwm4204	2A	55°	115	115	124	-
Xgwm0328	2A	55°	195	183	183	-
Xgwm0817	2A	47°	191	191	181	-
Xgwm0445	2A	55°	185	185	194	-
Xgwm0312	2A	60°	183	183	191	-
Xgwm0294	2A	55°	68	68	96	-
Xgwm0060	7A	60°	237	-	-	218
Xgwm0631	7A	60°	197	-	-	206
Xgwm0748	7A	60°	160	-	-	148
Xgwm1002	7D	60°	171+192	171	171+192	-
Xgwm0044	7D	60°	171	175	173	-
Xgwm0676	7D	50°	141+143	158+160	143+145	-
Xgwm0111	7D	55°	221	198	198	-
Xgwm0437	7D	50°	100	106	100+130	-

2.2.2.2. Выделение ДНК

ДНК экстрагировали из листьев каждого растения F₂ от каждого скрещивания и из растений родительских линий в соответствии с процедурой модифицированного протокола Plaschke et al. (1995). Около 100 мг свежей зеленой массы (листья 2-3 недельных проростков) помещали в пробирку объемом 1.5 мл, добавляли 200 мкл буфера для экстракции (100мМ Трис-НСl, рН 7.5; 500мМ NaCl; 50мМ ЭДТА; 1.25% SDS; 3.8% Na₂S₂O₅) и, измельчали с помощью гомогенизатора. Далее добавляли еще 500 мкл буфера для экстракции и инкубировали на водяной бане при 60°С в течение 30 минут. К этой смеси добавляли 700 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), перемешивали и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин. Для осаждения ДНК к водной фазе добавляли 1.4 мл 96 % этанола, охлажденного при -20°С, центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок высушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE (10мМ трис-НСl, рН 8.0; 1мМ ЭДТА).

2.2.2.3. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 100нг ДНК-матрицы, 67мМ трис-НСl (рН 8.8), 1.8мМ MgCl₂, 0.01% Tween 20, 18мМ (NH₄)₂SO₄, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq, в следующих условиях: преденатурация – 2 минуты при 94°C; денатурация - 1минута при 94°C; отжиг матрицы с праймерами - 1 минута при 47, 50, 55 или 60°C (см. табл. 7); полимеризация - 2 минуты при 72°C; число циклов – 45; достраивание ПЦР-фрагментов – 15 минут при 72°C.

2.2.2.4. Электрофоретический анализ ДНК

Электрофоретический анализ геномной ДНК и ПЦР-продуктов проводили согласно методике Maniatis et al. (1982) с модификациями. Анализ геномной ДНК проводили в 1% агарозном геле, приготовленном на ТАЕ-буфере (40мМ Трис-НСl рН 8.0, 20мМ ацетат натрия, 1мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. Разделение продуктов ПЦР проводили в 5% HR (High resolution) агарозном геле высокого разрешения “Nu Agarose™” (Hydragene Co., Ltd.), приготовленном на ТАЕ-буфере. В карманы геля наносили по 20 мкл реакционной смеси с добавлением 5% глицерина, 0.05% бромфенолового синего и 0.05% ксиленианола. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркер «100bp» (ООО Лаборатория МЕДИГЕН). Электрофорез вели при напряжении 3-7 вольт/см в течение 3-5 часов, затем фотографировали в УФ-свете с помощью системы документации гелей «Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System» (Bio-Rad). Для измерения длины полученных фрагментов использовали программу анализа изображений гелей «GelAnalyzer» Версия 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>).

2.2.3. Анализ транскрипции

2.2.3.1. Выделение РНК, обратная транскрипция

Анализ транскрипции генов биосинтеза флавоноидов *Chi*, *F3h* (*F3h-1*) и *TaMyc1* (кандидата для гена *Pp3*) в перикарпе проводился на линиях, отмеченных в таблице 5 звездочкой. Образцы тотальной РНК были выделены из перикарпа семян молочной спелости, по 3 повторности для каждой линии (с трех - пяти растений для каждой повторности каждой линии). Свежие ткани перикарпа замораживали в жидком азоте и растирали в порошок в ступке. Затем выделяли суммарную РНК при использовании набора реагентов «Zymo Research Plant RNA MiniPrep™ kit» (www.zymoresearch.com). Проводили обработку ДНКзой («RNase-free DNase set», Qiagen). Концентрацию РНК в конечном растворе определяли с помощью спектрофотометра «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific). Одноцепочечную кДНК синтезировали из 0,7 мкг суммарной РНК с использованием праймера (dT)₁₅ и набора реагентов «Fermentas RevertAid Transcription kit» (www.thermoscientificbio.com/fermentas) в объеме 20 мкл. Все процедуры выполнялись согласно протоколам, прилагаемым к используемым наборам.

2.2.3.2. Количественная ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции

Количественная ПЦР на основе обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводилась на кДНК, полученной после реакции обратной транскрипции, в расчете на одну реакцию в количестве 1/150 объема от реакционной смеси, содержащей 1 пмоль прямого и обратного праймеров, амплифицирующих фрагменты генов *Chi* (*Chi-1*) и *F3h* (*F3h-1*), или 3,5 пмоль праймеров для *TaMyc1*, при использовании набора реагентов «Синтол SYBR Green I» (<http://www.syntol.ru/productmix.htm>) в количествах согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР проводили в режиме реального времени в системе «ABI Prism 7000 Sequence Detection System» (www.lifetechnologies.com) в

реакционной смеси объемом 15 мкл в следующих условиях: преденатурация – 15 минут при 95°C; денатурация – 15 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 60°C; полимеризация – 30 секунд при 72°C; число циклов – 40; затем снимались показания для построения кривых плавления продуктов ПЦР в условиях: 15 секунд при 95°C; 15 секунд при 60°C; 15 секунд при 95°C.

Анализ данных ОТ-ПЦР в реальном времени проводили при использовании программы SDS1.2.3. методом порогового сравнения графиков накопления ДНК (Ct) с определением эффективности ПЦР по последовательным разбавлениям образца. Графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц строились на основе 4 последовательных 4-кратных разведений. Для стандартизации количества кДНК-матрицы проводилась количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену *Ubc*. Для ОТ-ПЦР использовали праймеры, разработанные в секторе функциональной генетики злаков ИЦиГ СО РАН (табл. 8)

Таблица 8. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Ссылка
<i>Chi</i>	ctcgccgccaagtggg	ttctcgaactcgcgggtgac	Gordeeva et al., 2014
<i>F3h</i>	aaggcggttcatcgtctc	ccctccagtctgcaccgc	Gordeeva et al., 2014
<i>TaMyc1</i>	aaccatgtcatttcggagagga	ggccgccctgttgatc	Shoeva et al., 2014в
<i>Ubc</i>	atttgtgaagaccctaccg	caccaagtgaagggtggact	Himi et al., 2005

Количественная ОТ-ПЦР для каждого образца кДНК проводилась в трех повторах. При построении графиков зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц во всех экспериментах значение R2 превышало 0.97. Различия между линиями были протестированы с помощью критерия Манна-Уитни (*U*-test), принимая $p \leq 0,05$ за значимые (см. главу

2.2.5.). Примеры графиков накопления ДНК, графиков зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц и кривых плавления, полученных в настоящей работе, приведены в Приложении.

2.2.4. Выделение и анализ содержания антоцианов

Экстракцию антоцианов и измерения проводили для линий, отмеченных в таблице 5 звездочкой. Антоцианы выделяли экстракцией в 1%-м растворе HCl в метаноле из перемолотых в жидком азоте цельных зерен изогенных линий пшеницы согласно методике (Christie et al., 1994) с модификациями. Добавляли 1%-й раствор HCl в метаноле из расчета 1 мл раствора на 200 мг растертой ткани для каждой повторности, тщательно перемешивали. Экстракты оставляли на ночь при +4°C. Затем проводили центрифугирование образцов в течение 30 минут при +4°C при 12000 об/мин, после чего отбирали супернатант и использовали его для количественной оценки оптической плотности содержания антоцианов в растворе на спектрофотометре «SmartSpec™Plus» (BioRad) при длине волны 530 нм. Эксперимент проводили в 3-х повторностях для каждой линии. Для оценки достоверности различий между линиями использовали критерий Манна-Уитни (*U*-test) (Васильева, 2007).

2.2.5. Методы статистического и компьютерного анализа

Соответствие расщепления по маркерам и признакам, наблюдаемого в популяциях, к теоретически ожидаемому определяли с помощью критерия χ^2 (Гершензон, 1979). Генетическое расстояние между локусами *Pp* и *Rc* вычисляли с помощью программы MAPMAKER 2.0 (Lander et al., 1987). Оценка достоверности различий между средними значениями оценивалась с помощью статистического теста Манна-Уитни (*U*-test) (Васильева, 2007).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Маркер-контролируемое получение изогенных линий пшеницы с различными комбинациями аллелей в локусах *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*

3.1.1. Схема скрещиваний (гибридизация и фенотипирование)

Изогенные линии на основе краснозерного сорта Саратовская 29 (*i:S29Pp1Pp2^{PF}* и *i:S29Pp1Pp3^P*), выведенные в ИЦиГ СО РАН Арбузовой с соавторами (Arbuzova et al., 1998), имеют фиолетовую окраску зерна (интенсивно окрашенные) и несут гены, регулирующие биосинтез антоцианов в перикарпе зерна (гены *Pp*) в хромосомах 2A и 7D (Tereshchenko et al., 2012). Протяженность участков интрогрессии от сортов-доноров (PF - Purple Feed и P - Purple) различается между линиями. У линии *i:S29Pp1Pp3^P* (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*) участок от сорта-донора (Purple) в хромосоме 2A короче, а в 7D, наоборот, длиннее (Tereshchenko et al., 2012).

На рисунке 8 представлена схема скрещиваний, проведенных в настоящей работе, с использованием исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}*, где красным цветом отмечены участки интрогрессии от сорта Purple Feed. Схема скрещиваний от исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* аналогична.

На первом этапе было проведено бэккроссирование каждой из линий *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* с родительским сортом Саратовская 29 (S29), содержащим набор рецессивных аллелей генов *pp-D1* и *pp3* (*i:S29Pp-A1pp-D1pp3*).

На втором этапе полученные линии с доминантными аллелями генов *Pp-A1* и *Pp3* (*i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*) скрещивались с линией - донором рецессивного аллеля *pp-A1* (*i:S29pp-A1pp-D1pp3*), имеющей небольшой участок интрогрессии в хромосоме 7A, перенесенный от сорта Yanetzki's Probat (YP).

Основной целью было получение разных сочетаний доминантных и рецессивных аллелей комплементарных генов *Pp*. Так как в отсутствие

доминантного аллеля хотя бы одного из двух комплементарных генов перикарп не окрашивается, вести получение новых линий только на основе фенотипических данных было бы трудной задачей и потребовало бы анализа большого количества материала, а также проведения целого ряда анализирующих скрещиваний. Дополнительной трудностью является невозможность отличить на уровне фенотипа гетерозиготы по генам *Pp* от доминантных гомозигот. Чтобы избежать перечисленных трудностей и ускорить процесс создания необходимых линий, был привлечен метод отбора с помощью маркеров.

3.1.2. Маркер контролируемый отбор полученных растений пшеницы

Использовался комбинированный подход с применением молекулярных (микросателлитных) и фенотипических («окраска перикарпа» и «окраска coleoptile») маркеров. Возможность использования *Rc* в качестве маркера для отбора линий с нужным аллелем *Pp* показана в настоящей работе (рис. 9).

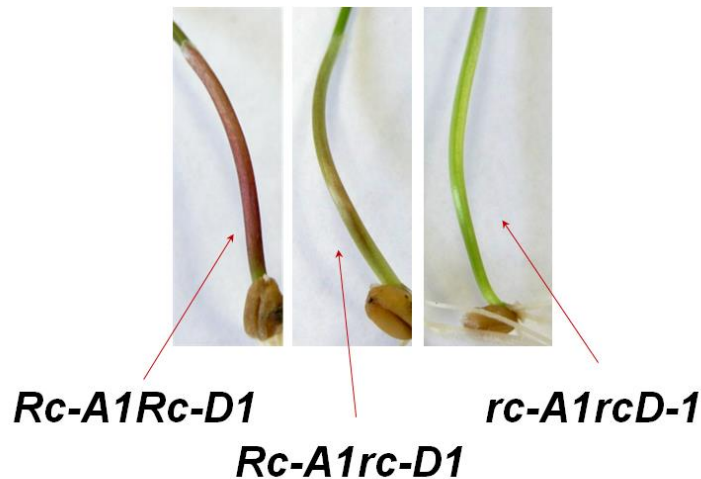


Рис. 9. Окраска coleoptile проростков пшеницы, имеющих различные комбинации генов *Rc*.

3.1.2.1. Оценка возможности использования маркера *Rc*

Для идентификации генов *Rc* в сортах Purple Feed и Purple, были проведены тесты на аллелизм при использовании сортов с известными генами *Rc* (см. табл.6 гл. 2.1), а именно: сорт Саратовская 29 со слабой пигментацией колеоптиле, контролируемой геном *Rc-A1*, и Новосибирская 67 с интенсивной пигментацией колеоптиле, контролируемой геном *Rc-D1*.

Результаты показали, что гены *Rc*, детерминирующие интенсивную пигментацию колеоптиле в сортах Purple Feed и Purple, аллельны гену *Rc-D1* сорта Новосибирская 67, тогда как при скрещивании Purple Feed и Purple с Саратовской 29, несущей ген *Rc-A1*, наблюдалось расщепление 15:1 (Саратовская 29 × Purple: $\chi^2 = 0.152$, $P > 0.50$; Саратовская 29 × Purple Feed: $\chi^2 = 0.116$, $P > 0.70$).

Поскольку при скрещивании с сортом Саратовская 29 наблюдалось расщепление, мы использовали популяцию Саратовская 29 × Purple для анализа сцепления между генами *Pp-D1* и *Rc-D1*.

По окраске колеоптиле в популяции Саратовская 29 × Purple из 127 F₂ растений выявлены 97, имеющих интенсивную окраску колеоптиле (*Rc-D1*), тогда как 30 F₂ растений имели не окрашенное или слабо окрашенное колеоптиле (*rc-D1*), что соответствовало моногенному расщеплению по гену *Rc-D1* ($\chi^2_{3:1} = 0,129$, $P > 0,70$). По окраске перикарпа в этой же популяции (Саратовская 29 × Purple) выявлены 73 растения с фиолетовым зерном и 54 - с неокрашенным зерном, что соответствовало расщеплению 9:7, характерному при наследовании признаков, контролируемых двумя доминантными комплементарными генами ($\chi^2_{9:7} = 0,078$; $P > 0,70$).

Было принято во внимание, что отсутствие антоцианового пигмента в перикарпе некоторых растений F₂ могло быть связано с наличием рецессивного аллеля *pp3*. Поэтому было проведено генотипирование популяции с помощью микросателлитных маркеров, сцепленных с геном *Pp3* (*Xgwm0328*, *Xgwm0445*, *Xgwm0817*), и в результате 21 растение, несущее в

данных микросателлитных локусах аллели сорта Саратовская 29, было исключено из дальнейшего анализа. Среди остальных 106 растений 73 имели фиолетовые и 33 - неокрашенные зерна, что соответствовало моногенному расщеплению по гену *Pp-D1* ($\chi^2_{3:1} = 1,855$; $P > 0,10$). Рекомбинация между генами, контролирующими признаки «темная окраска coleoptile» (ген *Rc-D1*) и «окраска перикарпа» (*Pp-D1*) наблюдалась в трех из 106 растений. Данные по фенотипированию с учетом генотипирования с помощью микросателлитных маркеров, сцепленных с геном *Rc-D1* (*Xgwm0044*, *Xgwm0676*, *Xgwm0437*), использовались для вычисления рекомбинационного расстояния между генами *Rc-D1* и *Pp-D1*, которое составило 2,5 сМ. Порядок данных маркеров и генов и расстояния между ними были следующими: 7AS – *Xgwm0044* – 12,6 сМ – *Pp-D1* – 2,5 сМ – *Rc-D1* – 8,7 сМ – *Xgwm0676* – 10,7 сМ – *Xgwm0437* – центромера.

3.1.2.2. Отбор растений с помощью фенотипических маркеров

Поскольку нами было показано, что гены *Pp-D1* и *Rc-D1* тесно сцеплены, окраска coleoptile, использовалась как маркер для отбора растений, несущих *Rc-D1* (темная окраска coleoptile) или *rc-D1* (неокрашенные или светло окрашенные coleoptile), что позволяло осуществить предварительную сортировку F_2 на растения, имеющие аллель *Pp-D1* или *pp-D1*. Аналогичным образом *Rc-A1* (контролирующий светлую окраску coleoptile) использовался как маркер для отбора по *Pp-A1*. Окраска перикарпа тоже использовалась как маркер и позволяла исключить растения, в которых оба гена *Pp-1* и *Pp3* сохранялись в доминантном состоянии: темная окраска в случае комбинации *Pp-D1+Pp3*, светлая окраска - *Pp-A1+Pp3* (рис. 8).

В первой серии скрещиваний каждой из линий $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P$ с родительским сортом С29 все растения поколения F_1 при созревании демонстрировали фиолетовый цвет перикарпа, что

согласовывалось с ожидаемым гетерозиготным состоянием генов *Pp-D1* и *Pp3*.

Растения F_2 от каждого скрещивания были разделены на стадии проростков на 2 группы в зависимости от окраски coleoptile. Растения с темным цветом coleoptile (с доминантным аллелем *Rc-D1*) были использованы для дальнейшего отбора линий $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P$. Растения со слабой антоциановой пигментацией coleoptile (с рецессивным аллелем *rc-D1* в хромосоме 7D и доминантным аллелем *Rc-A1* в хромосоме 7A) были использованы для дальнейшего отбора линий $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ и $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P$.

Таким образом, полученные растения линий с доминантными *Pp-D1* и рецессивными *pp3* имели интенсивно окрашенные coleoptile и неокрашенный перикарп. Растения линий с рецессивным *pp-D1* и с доминантным *Pp3* имели слабо окрашенные coleoptile (из-за гена *Rc-A1* на хромосоме 7A) и слабо окрашенный перикарп. Тот факт, что у растений с рецессивным *pp-D1* и с доминантным *Pp3* не наблюдалось полного исчезновения антоцианового пигмента в перикарпе заставил впервые высказать предположение о существовании гомеологичного аллеля *Pp-A1* в хромосоме 7A, который у Саратовской 29 присутствует в доминантной форме. Для того, чтобы проверить эту гипотезу и получить линии, в которых доминантные и рецессивные аллели гена *Pp3* и гипотетического гена *Pp-A1* комбинировались бы по-разному, и была проведена вторая серия скрещиваний.

На этом этапе проводились скрещивания полученных линий $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ и $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P$ с родительской линией $i:S29pp-A1pp-D1pp3$ ($i:S29/ YP 140$). У данной линии в отличие от Саратовской 29, имеющей слабую антоциановую пигментацию coleoptile, стебля и листа, эти вегетативные органы не имели окраски, поэтому предполагалось наличие у нее рецессивного аллеля и в гипотетическом локусе *Pp-A1*. В результате этих скрещиваний все растения поколения F_1 при созревании демонстрировали

слабую антоциановую пигментацию перикарпа, что согласовывалось с ожидаемым гетерозиготным состоянием генов *Pp-A1* и *Pp3*. Проростки растений поколения F₂ от каждого скрещивания были разделены на 2 группы по цвету колеоптиле: со слабо окрашенным и неокрашенным колеоптиле. Растения с неокрашенными колеоптиле, несущие одновременно рецессивные аллели в локусах *Rc-D1* и *Rc-A1*, были использованы далее для отбора линий *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P* с помощью микросателлитных маркеров. Растения линий *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P* имели неокрашенные колеоптиле и перикарп. Что подтвердило наличие гена *Pp-A1* в доминантном состоянии у сорта Саратовская 29 и в рецессивном состоянии у родительской линии *i:S29pp-A1pp-D1pp3*.

3.1.2.3. Отбор изогенных линий с помощью молекулярных маркеров

На каждом этапе скрещиваний полученные растения F₂, отобранные после оценки окраски колеоптиле, были генотипированы вместе с родительскими линиями. Генотипирование осуществлялось с помощью микросателлитных маркеров (табл. 7), фланкирующих гены *Pp* (рис. 8). Использование данных маркеров позволяло определять наличие/отсутствие фрагмента родителя-донора в соответствующей хромосоме и устанавливать, в каком состоянии (гетерозиготном или гомозиготном) находятся локусы, содержащиеся в этих участках хромосом. При анализе ДНК растений поколения F₂ от скрещивания изогенных линий и исходных родительских форм (Саратовская 29, *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{P/PF}*) 5 SSR маркеров: *Xgwm1002*, *Xgwm0044*, *Xgwm0676*, *Xgwm111* и *Xgwm437*, - на хромосоме 7D показали полиморфизм продуктов ПЦР в 5% агарозном геле высокого разрешения и были использованы для отбора растений с нужными признаками.

На хромосоме 2A, при анализе ДНК растений F₂ и исходных родительских форм (Саратовская 29, *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{P/PF}*) 6 маркеров: *Xgwm817*, *Xgwm445*, *Xgwm328*, *Xgwm312*, *Xgwm294* и *Xgwm4204*, - показали

полиморфизм продуктов ПЦР в 5% агарозном геле высокого разрешения. На рисунке 10 в качестве примера приведены результаты разделения продуктов ПЦР, полученных с праймерами к микросателлитным локусам *Xgwm0111* (хромосома 7D), *Xgwm0445* и *Xgwm0817* (хромосома 2A).

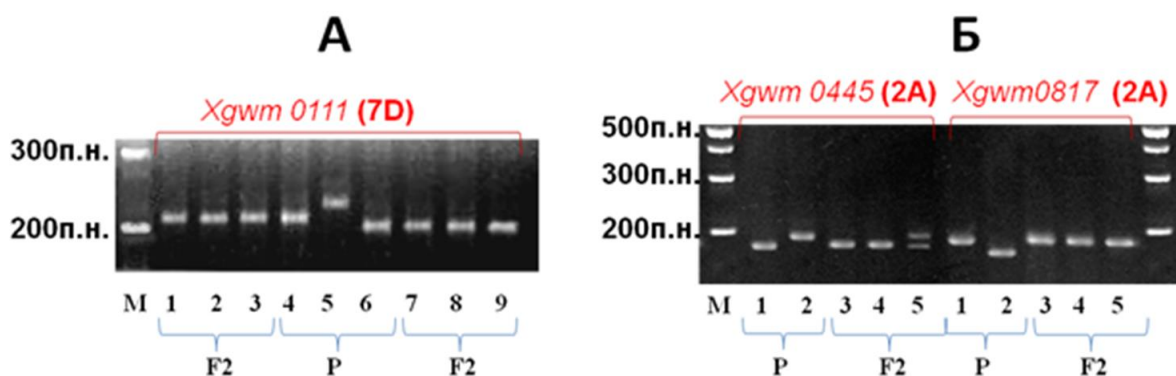


Рис.10. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к микросателлитным локусам:

А) *Xgwm0111* на ДНК Саратовской 29 (дорожка 5), *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^P* (4), *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^{PF}* (6) и F_2 растений $C29 \times i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^P$ (1-3), $C29 \times i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^{PF}$ (7-9);

Б) *Xgwm0445* и *Xgwm0817* на ДНК Саратовской 29 (дорожка 1), *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^{PF}* (2) и F_2 растений $C29 \times i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^{PF}$ (3-5). Видно, что растение, которому соответствует дорожка 5, является гетерозиготой в локусе *Xgwm0445*.

В результате анализа продуктов ПЦР по всем полиморфным маркерам были отобраны по 2 растения каждой новой формы и размножены изогенные линии с различными комбинациями аллелей генов *Pp-D1* и *Pp3* от каждого сорта-донора Purple Feed и Purple. Растения полученных линий с доминантными аллелями *Pp-D1* и рецессивными *pp3* имели интенсивно окрашенные coleoptiles и неокрашенный перикарп. Растения линий с рецессивными аллелями *pp-D1* и с доминантными *Pp3* имели слабо окрашенные coleoptiles (из-за присутствия гена *Rc-A1* на хромосоме 7A) и слабо окрашенный перикарп (из-за присутствия гена *Pp-A1* на хромосоме 7A).

На следующем этапе работы растения вновь полученных линий *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^{PF}* и *i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^P* были скрещены с *i:S29pp-A1Pr-D1Pr3* (рис. 8). Растения F_2 , отобранные после оценки окраски coleoptiles, были генотипированы вместе с родительскими линиями с помощью

микросателлитных маркеров, фланкирующих гены *Pp-A1* и *Pp3* (см. табл. 7 гл.2.2.2.1.).

При анализе ДНК изогенных линий и исходных родительских форм (Саратовская 29, S29/YP 140), 3 маркера, локализованных в хромосоме 7А показали полиморфизм в 5 % агарозном геле высокого разрешения и были использованы для отбора растений с нужными признаками: *Xgwm0060*, *Xgwm0631* и *Xgwm0748*. В поколении F₂ растения с рецессивными аллелями *pp-A1*, наследуемыми от Yanetzki's Probat, и с доминантными аллелями *Pp3*, наследуемыми от Purple Feed и Purple, были обозначены *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P* соответственно.

Таким образом, при использовании гибридизации растений совместно с анализом фенотипических и молекулярных маркеров удалось за три вегетационных периода в теплице и парнике (1 год) получить гомозиготные растения с различными сочетаниями доминантных и рецессивных аллелей *Pp3* и *Pp-D1*, и затем в ходе двух дополнительных вегетаций (меньше года) получить на их основе линии с разными аллелями *Pp-A1* (см. табл. 5).

3.2. Анализирующие скрещивания

Для проверки наличия доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3* в полученных линиях были проведены скрещивания: *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}* × *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P* × *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*, - с дальнейшей оценкой фенотипа растений поколения F₁ (рис. 8). Фиолетовая окраска перикарпа была восстановлена у растений F₁ в каждом скрещивании, что указывает на присутствие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3* в линиях, отобранных с помощью маркеров (рис. 11). Аналогичным образом, были проведены скрещивания: *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* × *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}* и *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P* × *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P*, - с дальнейшей оценкой

фенотипа растений поколения F_1 (рис. 8). В данных скрещиваниях также наблюдалось восстановление фиолетового перикарпа у растений F_1 , что подтверждает присутствие доминантного аллеля $Pp3$ в линиях $i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ и $i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P$, отобранных на последнем этапе работы (табл. 5, рис. 8).

Линии $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ могут быть использованы в качестве тестерных линий для выявления доминантных аллелей каждого из двух комплементарных генов $Pp3$ и $Pp-D1$, соответственно, в других линиях и сортах. В настоящей работе линия $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ использовалась в качестве тестерной для скрещивания с линией $i:S29Ra$.

Данная линия по литературным данным имеет антоциановую окраску ушек листового влагалища (Arbuzova et al., 1998). Проверка окраски coleoptile и перикарпа показала, что $i:S29Ra$ имеет интенсивно окрашенное coleoptile и неокрашенный перикарп. Тест на аллелизм ($i:S29Ra \times$ Новосибирская 67; табл. 6) показал, что ген Rc линии $i:S29Ra$ аллелен гену Rc сорта Новосибирская 67, то есть $i:S29Ra$ несет доминантный ген $Rc-D1$. Наличие этого гена заставило предположить, что по аналогии с Purple Feed и Purple в хромосоме 7D линии $i:S29Ra$ ген $Rc-D1$ может быть сцеплен с $Pp-D1$. Для проверки этой гипотезы скрестили линию $i:S29Ra$ с одной из вновь созданных линий ($i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$), несущих рецессивный $pp-D1$, но доминантный комплементарный ген $Pp3$. Все растения в поколении F_1 от этого скрещивания имели интенсивную антоциановую пигментацию перикарпа (рис. 12). Данный результат подтвердил предположение о том, что линия $i:S29Ra$ имеет доминантный аллель $Pp-D1$.

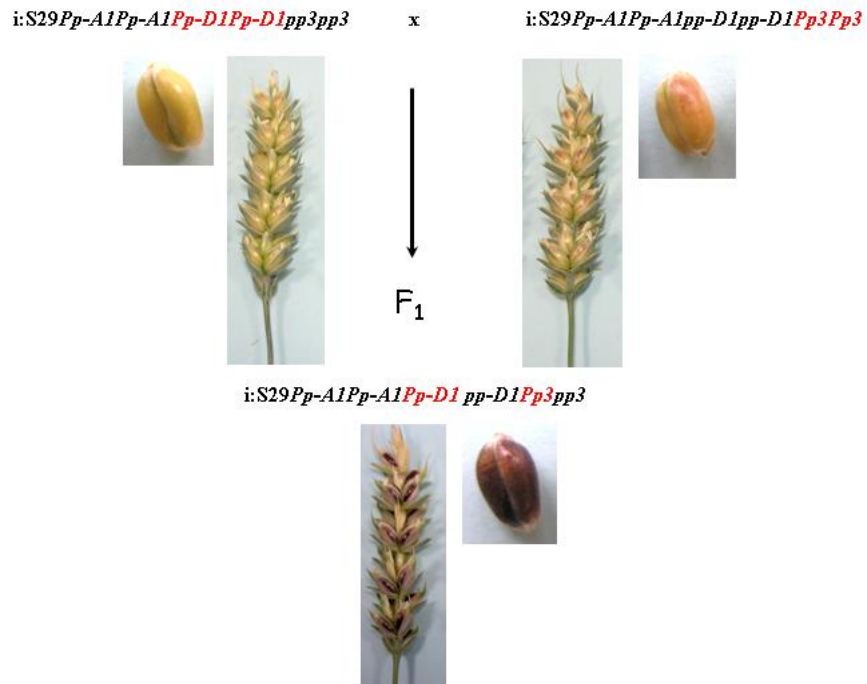


Рис. 11. Анализирующее скрещивание для проверки наличия доминантных аллелей: *Pp3* в линии *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3* и *Pp-D1* в линии *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3*. В F_1 наблюдается восстановление окраски перикарпа за счет комплементарного взаимодействия генов *Pp3* и *Pp-D1*. Это подтверждает, что полученные в работе линии *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3* и *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3* несут желаемые сочетания генов (*pp-D1Pp3* и *Pp-D1pp3*).

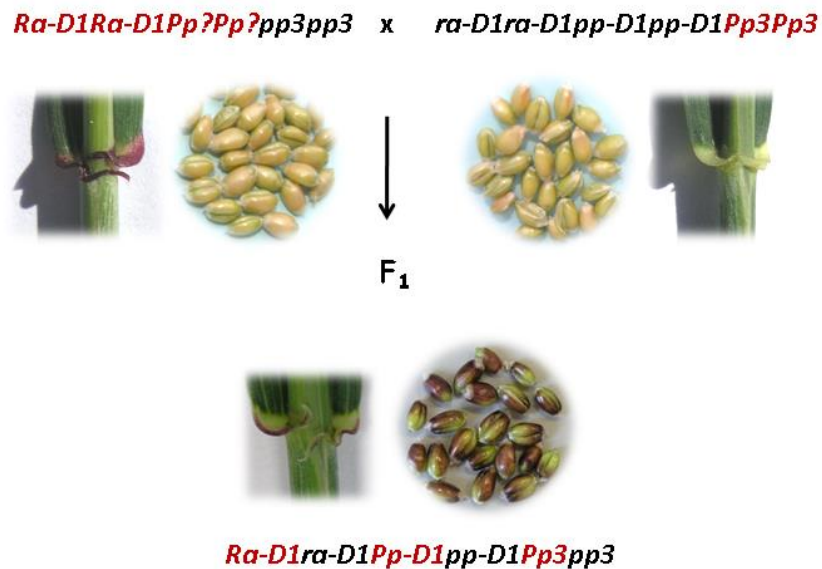


Рис. 12. Анализирующее скрещивание тестерной линии *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* (справа сверху) и линии *i:S29Ra* (слева сверху), позволившее выявить у линии *i:S29Ra* доминантный аллель *Pp-D1*.

3.3. Изучение относительного содержания антоцианов в цельном зерне изогенных линий пшеницы

Проведена количественная оценка относительного содержания антоцианов в цельном зерне изогенных линий пшеницы в фазе молочной спелости. В линиях с интенсивной окраской перикарпа (с доминантными аллелями одновременно в двух комплементарных локусах *Pp-D1* и *Pp3*) содержание антоцианов в 53-75 раз превышало таковое в остальных линиях (рис. 13).

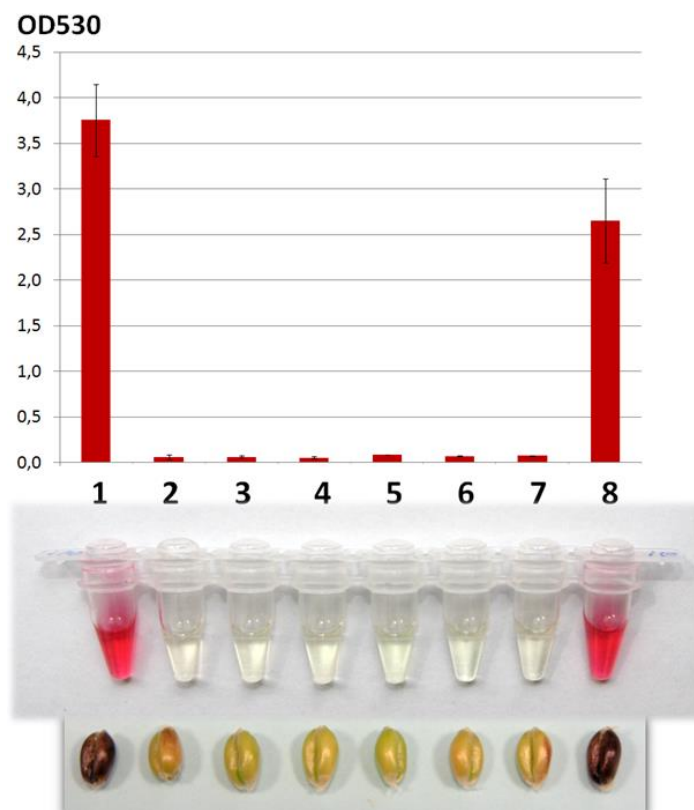


Рис. 13. Содержание антоцианов (А; OD530) и соответствующие экстракты антоцианов (Б) в зернах молочной спелости (В).

1 – *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}*,
 2 – *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*,
 3 – *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}*,
 4 – Саратовская 29,
 5 – *i:S29pp-A1pp-D1pp3*,
 6 – *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P*,
 7 – *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*,
 8 – *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*.

В частности, в зерне линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* относительное содержание антоцианов в 75 раз выше чем у Саратовской 29, а у линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* - в 53 раза выше, чем у С29. Между слабоокрашенным и неокрашенным зерном достоверных различий по относительному содержанию антоцианов выявлено не было. В Приложении (табл. 1 и 2) приведены данные статистического анализа.

3.4. Изучение функциональной роли отдельных генов *Pp* в регуляции транскрипции генов биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна пшеницы

3.4.1. Экспрессия генов *Chi* и *F3h* в перикарпе изогенных линий

С помощью количественной ПЦР на кДНК (ОТ-ПЦР в реальном времени) проведена оценка экспрессии структурных генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза антоцианов - халконфлаванонизомеразу (ген *Chi*) и флаванон-3-гидроксилазу (ген *F3h*) - в перикарпе изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*. Линии, взятые для анализа, помечены в таблице 5 звездочкой.

В целом, результаты на аналогичных наборах линий, полученных от линии $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$ и от $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P$, были сходными. Графическое изображение результатов на примере набора изогенных линий, полученных от исходной $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$, представлено на рисунке 14. В Приложении (табл. 3-8) приведены данные статистического анализа с помощью теста Манна-Уитни (*U*-test) для всех линий по каждому из тестируемых генов *Chi* и *F3h*.

Видно, что наиболее высокий уровень экспрессии гена *Chi* наблюдается в присутствии трех доминантных аллелей *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3* (рис. 14). Если ген *Pp3* находится в рецессивном состоянии, а *Pp-A1* и *Pp-D1* - в доминантном (в перикарпе растений, имеющих такой генотип, антоцианы не синтезируются), уровень экспрессии гена *Chi* значимо снижается в 4 раза по сравнению с $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3$ (рис. 14). Если наоборот, ген *Pp-D1* находится в рецессивном состоянии, а *Pp-A1* и *Pp3* в доминантном (при этом перикарп имеет слабую окраску за счет комплементарного взаимодействия *Pp-A1* и *Pp3*), уровень мРНК гена *Chi* достоверно снижается в 5 раз по сравнению с $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}$ (рис. 14). Между генотипами $Pp-A1Pp-D1pp3$ и $Pp-A1pp-D1Pp3$ различия по уровню экспрессии гена *Chi* недостоверны. Однако если оба гена *Pp-D1* и *Pp3* присутствуют в рецессивном

состоянии, а *Pp-A1* в доминантном (генотип Саратовской 29), уровень мРНК гена *Chi* достоверно ниже в 7 раз по сравнению с *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3* и в 1,5-2 раза по сравнению с генотипами *Pp-A1Pp-D1pp3* и *Pp-A1pp-D1Pp3* (рис. 14). В случае рецессивного состояния всех трех генов *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3* экспрессия *Chi* в 34 раза слабее по сравнению с *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3* и в 4,5 раза по сравнению с Саратовской 29. Но, тем не менее, ген *Chi* все равно экспрессируется в перикарпе линии *i:S29pp-A1pp-D1pp3*. Таким образом, на качественном уровне экспрессия гена *Chi* не зависит от наличия доминантных аллелей *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*; их присутствие влияет только на количественный уровень мРНК *Chi* (рис. 14).

Ген *F3h* активно экспрессируется в присутствие трех доминантных аллелей *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3* (рис. 14). Экспрессия данного гена в перикарпе растений, имеющих иные генотипы ничтожно мала по сравнению с *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}*. Например, *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* > *i:S29pp-A1pp-D1pp3* в $1,9 \times 10^3$ раза по уровню экспрессии *F3h*, *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* > Саратовской 29 в $0,9 \times 10^3$ раз, *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* > *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}* в $0,3 \times 10^3$ раз. Несколько меньше разрыв между *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* и *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* – в $1,3 \times 10^2$ раз. Видно, что сочетание доминантных аллелей *Pp-1+Pp3* критично для активации *F3h* (рис. 14). В случае линий с интенсивно окрашенным перикарпом (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}*) для активации *F3h* имеет критическое значение взаимодействие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3*. В случае линий со слабо окрашенным перикарпом (линия *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}*) взаимодействие *Pp-A1* и *Pp3* также имеет некоторое значение для активации *F3h* (рис. 14).

Таким образом, наблюдаются принципиальные различия между регуляцией гена *Chi* и *F3h* в перикарпе пшеницы. *Chi* экспрессируется во всех линиях, даже в генотипах, содержащих рецессивные аллели всех трех регуляторных генов *Pp*, а добавление доминантных аллелей в том или ином сочетании лишь повышает уровень транскрипции. Между тем, для активации

F3h критичным является одновременное присутствие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3* (рис. 14).

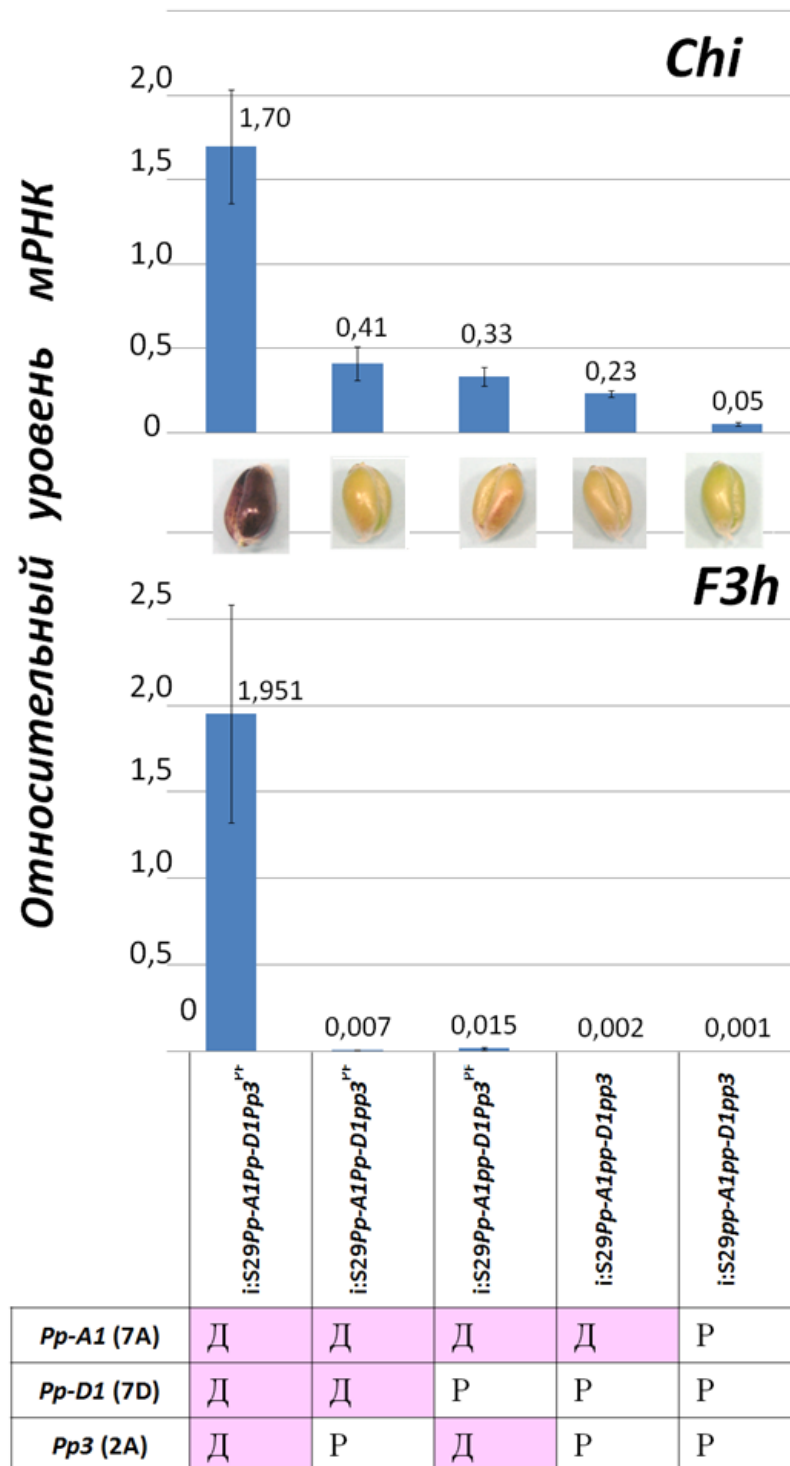


Рис. 14. Экспрессия генов *Chi* (верхний график) и *F3h* (нижний график) в перикарпе зерен молочной спелости в наборе изогенных линий пшеницы, полученных от исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}*. Д – доминантный аллель соответствующего гена, Р – рецессивный.

3.4.2. Использование полученных линий для изучения взаимодействия между генами *Pp*

С использованием полученного набора изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, была изучена транскрипционная активность гена *TaMyc1*, который является геном-кандидатом для *Pp3* (рис. 15).

Присутствие доминантного аллеля *Pp3* связано с существенно более высоким уровнем транскрипции *TaMyc1* по сравнению с сестринскими линиями, несущими рецессивный аллель *pp3*. Так, уровень экспрессии *TaMyc1* в линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* выше, чем в сестринской линии *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P* в $1,3 \times 10^2$ раза, в линии *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P* - выше, чем в *i:S29Pp-A1pp-D1pp3^P* в $1,5 \times 10^2$ раз (рис. 15). Это согласуется с предположением о том, что ген *TaMyc1* – и есть ген *Pp3* на молекулярном уровне. Таким образом, основные функциональные различия между доминантными и рецессивными аллелями гена *Pp3* заключаются в различии уровней их экспрессии. Рецессивный аллель *pp3* экспрессируется на незначительном фоновом уровне, тогда как доминантный аллель *Pp3* характеризуется высокой транскрипционной активностью.

При сравнении, проведенном между сестринскими линиями, отличающимися по доминантным и рецессивным аллелям гена *Pp-D1*, обнаружено, что *TaMyc1* экспрессируется слабее в присутствии доминантного аллеля комплементарного гена *Pp-D1*. Уровень мРНК *TaMyc1* в линии *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P* выше, чем в сестринской линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* в 2,4 раза, в линии *i:S29Pp-A1pp-D1pp3^P* - выше, чем в *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P* в 2,1 раза (рис. 15). Таким образом, доминантный ген *Pp-D1* частично супрессирует ген *TaMyc1* (*Pp3*).

Сходные тенденции наблюдались на двух аналогичных наборах линий: один набор от исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (рис. 15), другой – от

i:S29*Pp-A1Pp-D1Pp3*^{PF}. В Приложении приведены данные статистического анализа различий с помощью теста Манна-Уитни (*U*-test) для всех линий.

Таким образом, полученные данные, во-первых, подтверждают предположение о том, что *TaMyc1* – это и есть ген *Pp3* на молекулярном уровне, а, во-вторых, впервые выявлено, что между генами *Pp-D1* и *Pp3* существует взаимная регуляция, а именно, *Pp-D1* частично супрессирует *Pp3*.

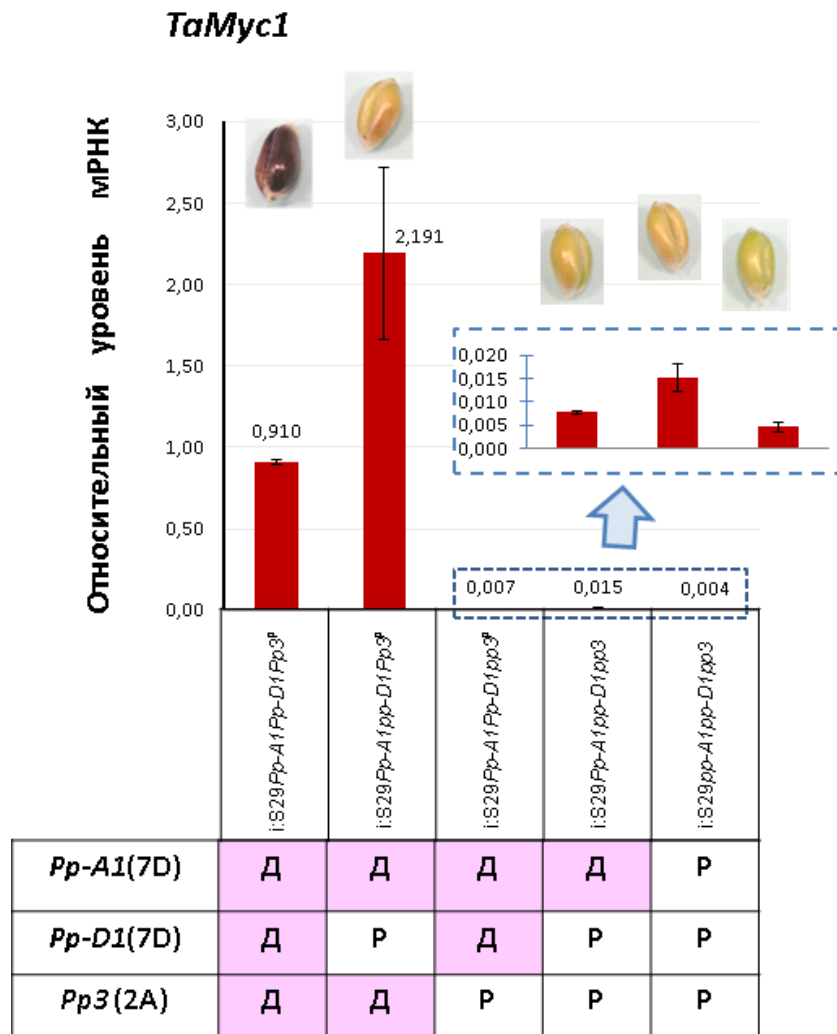


Рис. 15. Экспрессия гена *TaMyc1* в перикарпе зерен молочной спелости в наборе изогенных линий пшеницы, полученных от исходной линии i:S29*Pp-A1Pp-D1Pp3*^{PF}. Д – доминантный аллель соответствующего гена, Р – рецессивный.

Заключение к Главе 3

В настоящей работе при использовании комбинированного подхода: гибридизации растений, отбора по фенотипу и отбора по генотипу с помощью микросателлитных маркеров получен набор изогенных линий мягкой пшеницы с различными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp*. Гены *Pp3* и *Pp-D1* были известны до настоящей работы, ген *Pp-A1* - новый. Создано 6 новых линий: *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P*, и уточнен генотип (в локусе *Pp-A1*) четырех линий, использовавшихся в скрещиваниях в качестве родительских: *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (*i:S29Pp1Pp2^{PF}*), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (*i:S29Pp1Pp3^P*), *i:S29Pp-A1pp-D1pp3* (Саратовская 29), *i:S29pp-A1pp-D1pp3* (S29/YP 140). Кроме того, было показано, что сорта Purple Feed и Purple, а также линия *i:S29Ra* несут доминантные аллели гена *Rc-D1*, контролирующего интенсивную антоциановую окраску coleoptile. Выявлено тесное сцепление генов *Rc-D1* и *Pp-D1* (2,5 cM), что позволило использовать дополнительный фенотипический маркер «окраска coleoptile» наряду с ДНК-маркерами (микросателлитными) для отбора нужных растений при скрещиваниях.

Была продемонстрирована возможность использования полученных линий для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp*. С помощью новой изогенной линии пшеницы *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* в анализирующем скрещивании было доказано, что линия *i:S29Ra* несет в своем геноме доминантный аллель *Pp-D1*.

Далее, с использованием полученного набора линий была проведена оценка относительного содержания антоцианов в зерне и уровня транскрипции нескольких генов биосинтеза антоцианов в перикарпе. Показано, что у линий, несущих доминантные аллели *Pp-D1* и *Pp3*, содержание антоцианов в десятки раз выше по сравнению с линиями, в которых хотя бы один из этих генов находится в рецессивном состоянии.

Сравнительная оценка уровня транскрипции генов биосинтеза антоцианов *Chi*, *F3h* и *TaMyc1* в перикарпе была осуществлена с помощью количественной ОТ-ПЦР. Сравнение, проведенное на полученных в настоящей работе изогенных линиях и исходных родительских формах, позволило впервые изучить как особенности функционирования отдельных аллелей генов *Pp-1* и *Pp3*, так и их взаимодействие в процессе регуляции биосинтеза антоцианов в клетках перикарпа зерновки пшеницы.

В результате установлены принципиальные различия в регуляции транскрипции двух структурных генов биосинтеза антоцианов *Chi* и *F3h*. Для активации в перикарпе гена *F3h* критическим является одновременное присутствие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3*, тогда как усиление транскрипции гена *Chi* происходит и при наличии отдельных доминантных генов *Pp*.

Кроме того, полученные данные подтверждают предположение о том, что ген *TaMyc1*, кодирующий MYC-подобный фактор активации транскрипции, соответствует гену *Pp3* на молекулярном уровне. Также впервые установлено, что между генами *Pp-D1* и *Pp3* существует взаимная регуляция (частичная супрессия гена *Pp3* геном *Pp-D1*).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Маркер-контролируемое получение растений с заданным генотипом

Использование молекулярных маркеров ускоряет процесс селекции, ведет к повышению точности отбора, уменьшает посевные площади, занимаемые растительным материалом в процессе отбора и скрещиваний, позволяет задействовать меньше трудовых и материальных ресурсов (Moose and Mumm, 2008; Леонова, 2013; Хлесткина, 2013). Для генотипирования пшеницы на сегодняшний день чаще всего применяются микросателлитные (или SSR) маркеры, которые отличаются относительно частой и равномерной встречаемостью в геноме, высоким уровнем полиморфизма (Хлесткина и Салина, 2006; Леонова, 2013).

Помимо микросателлитных маркеров в селекции пшеницы используются также ген-специфичные ПЦР-маркеры (Беспалова и др., 2012). Не потеряли своей актуальности и могут использоваться в отдельных случаях и фенотипические маркеры, которые являются генетическими маркерами, соответствующими аллелям с четко выраженными отличиями на уровне фенотипа.

В настоящей работе для ускорения отбора генотипов с четко заданными свойствами использовался маркерный ген *Rc-D1*. Его доминантный аллель контролирует характерную интенсивную окраску колеоптиле. Поскольку в настоящей работе было показано, что ген *Rc-D1* располагается на расстоянии 2,5 сМ от гена *Pp-D1* в коротком плече хромосомы 7DS (Tereshchenko et al., 2012), окраска колеоптиле использовалась как маркер для отбора растений. Проростки в поколении F₂ изучались на присутствие доминантных и рецессивных аллелей гена *Pp-D1* с целью дальнейшего создания линий $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ соответственно. Таким образом, удалось существенно сократить количество высеваемых растений, из

которых выделялась ДНК для генотипирования, и которые далее использовались для создания изогенных линий.

Ген *Rc-D1* как маркер для отбора растений на ранних стадиях развития может использоваться и для селекции по тесно сцепленным с ним генам, контролирующим количественные признаки, в частности, массу зерна (Röder et al., 2008), устойчивость к септориозу (Arraiano et al., 2001; Adhikari et al., 2004; Simon et al., 2010), устойчивость к тле (Liu et al., 2001, 2002).

Однако признаки окраски не всегда стабильны. В отличие от темной окраски колеоптиле, которая стабильно проявляется при проращивании зерен пшеницы в определенных условиях в климатической камере (и потому может использоваться как маркер), антоциановая окраска ушек листового влагалища, отличается нестабильным проявлением (Zeven 1985; Гончаров, 2002). По этой причине долго не удавалось картировать гены *Ra*, контролирующие данный признак. Однако именно с помощью гена *Rc-D1*, как маркера, недавно удалось картировать в хромосоме 7DS ген *Ra-D1*, контролирующей окраску ушек (Khlestkina et al., 2014).

В настоящей работе для отбора доминантных и рецессивных аллелей гена *Pp-D1*, кроме генетического маркера *Rc-D1*, использовались микросателлитные маркеры, фланкирующие ген *Pp-D1*. Из их числа, маркеры *Xgwm0044*, *Xgwm0111*, *Xgwm0437*, аллели которых наиболее четко амплифицируются и различаются по длине в 5% агарозном геле высокого разрешения. В том числе, эти маркеры показывают четкие различия между гомозиготами и гетерозиготой (см. пример на рисунке 10а гл. 3.1.2.3.), и могут быть рекомендованы для использования в дальнейшем селекционном процессе, направленном на введение гена *Pp-D1* в различные сорта пшеницы.

Для гена *Pp3* тесно сцепленного фенотипического маркера, подходящего для отбора на ранних стадиях, не было, поэтому использовались только микросателлитные маркеры. Из их числа *Xgwm4204*, *Xgwm0817*, *Xgwm0445*, *Xgwm0312* (см. пример на рисунке 10б гл. 3.1.2.3.) могут быть рекомендованы для использования в дальнейшем при отборе генотипов,

содержащих ген *Pp3*. Для отбора растений на поздних стадиях развития в качестве фенотипического маркера использовалась светлая (розовая) окраска перикарпа, которая впервые была выявлена в данной работе. Установлено также, что этот признак контролируется совместным действием доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-A1* (Gordeeva et al., 2014).

В результате, в настоящей работе создано 6 новых линий: *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P*, и уточнен генотип (в локусе *Pp-A1*) четырех линий, использовавшихся в скрещиваниях в качестве родительских: *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (*i:S29Pp1Pp2^{PF}*), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (*i:S29Pp1Pp3^P*), *i:S29Pp-A1pp-D1pp3* (Саратовская 29), *i:S29pp-A1pp-D1pp3* (S29/YP 140).

Подсчет потенциального срока и объема работы, при которых отбор проводился бы без использования микросателлитных маркеров и маркера *Rc-D1*, и сравнение с затраченными в настоящей работе ресурсами позволили сделать вывод о том, что благодаря использованию маркеров процесс создания линий удалось ускорить вдвое, а объем исследуемого растительного материала сократить в 70 раз (Gordeeva et al., 2014).

4.2. Гомеологичные копии генов *Pp*

До настоящей работы в седьмой гомеологической группе хромосом пшеницы было выявлено два гена *Pp*: *Pp-B1* в хромосоме 7BS твердой пшеницы (Khlestkina et al., 2010a) и *Pp-D1* в хромосоме 7DS мягкой пшеницы (Tereshchenko et al., 2013).

К настоящему моменту показано, что большинство генов мягкой пшеницы присутствуют в ее геноме в виде гомеологичных копий, ведущих свое происхождение от общего предкового гена. Например: в хромосомах 1A, 1B и 1D локализованы гомеологичные копии гена *Rg-1*, контролирующего окраску колоса (Khlestkina et al., 2006); в хромосомах 2A, 2B и 2D – копии гена

Ppd-1, определяющего чувствительность к фотопериоду (Börner et al., 1998), и *F3h-1*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза флавоноидов флаванон-3-гидроксилазу (Khlestkina et al., 2011б); в хромосомах 3A, 3B и 3D – копии гена *R-1*, контролирующего красную окраску зерна (Flintham and Gale, 1995), и *S-1*, определяющего сферококкоидную форму колоса (Salina et al., 2000); в хромосомах 5A, 5B и 5D – копии гена *Vrn-1*, контролирующего чувствительность к яровизации (Börner et al., 1998), и *Chi-1*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза флавоноидов халконфлаванонизомеразу (Shoeva et al., 2014a); а в хромосомах 7A, 7B и 7D – гомеологичные копии генов, контролирующих окраску стебля (*Pc-1*), листа (*Pls-1* и *Plb-1*), колептиле (*Rc-1*) и пыльников (*Pan-1*) (Хлесткина, 2012). Эти данные согласуются с законом гомологических рядов, сформулированным Н.И. Вавиловым (1935).

Можно было предположить и наличие третьей гомеологичной копии гена *Pp-1* в хромосоме 7AS, но до настоящей работы этот факт установлен не был. В процессе создания изогенных линий с разными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp* было обнаружено, что отобранные нами гомозиготные растения с доминантным аллелем *Pp-D1* и рецессивным аллелем *pp3* имеют, как и ожидалось, неокрашенный перикарп, тогда как растения с генотипом *pp-D1pp-D1Pp3Pp3* сохраняли слабую антоциановую пигментацию перикарпа (Gordeeva et al., 2014). При этом различие между генотипами *Pp-D1Pp-D1Pp3Pp3* и *pp-D1pp-D1Pp3Pp3* по относительному содержанию антоцианов в зерне составило более одного порядка.

Было выдвинуто два предположения, объясняющие неполное ингибирование биосинтеза антоцианов в перикарпе растений, имеющих генотип *pp-D1pp-D1Pp3Pp3*: (1) аллель *Pp3* в отсутствие комплементарного действия гена *Pp-D1* сохраняет остаточную регуляторную активность, необходимую для запуска биосинтеза антоцианов в перикарпе; (2) в хромосоме 7AS Саратовской 29 присутствует ген *Pp-A1* с функцией

аналогичной гомеологам *Pp-B1* и *Pp-D1*, но с более слабой активностью по сравнению в ними.

Вторая гипотеза имела под собой следующее обоснование: каждый из генов *Pp-B1* и *Pp-D1* кластеризуется с генами, контролирующими окраску вегетативных органов *Pp-B1* с *Pc-B1*, *Rc-B1*, *Pls-B1*, *Plb-B1* в хромосоме 7B; *Pp-D1* с *Pc-D1*, *Rc-D1*, *Pls-D1*, *Plb-D1* в хромосоме 7D (Хлесткина, 2012). И, вместе с тем, как раз в хромосоме 7AS сорта Саратовская 29 присутствует кластер генов *Pc-A1*, *Rc-A1*, *Pls-A1*, *Plb-A1*, контролирующих слабую антоциановую пигментацию вегетативных органов пшеницы (Khlestkina et al., 2010б).

Для проверки наличия гена *Pp-A1* в хромосоме 7AS Саратовской 29, полученные линии, имеющие генотип *pp-D1pp-D1Pp3Pp3*, скрестили со специально подобранной линией, описанной ранее в числе рекомбинантных линий в работе Khlestkina et al. (2010б). В этой работе был описан генотип 108 рекомбинантных линий – удвоенных гаплоидов, полученных от скрещивания сорта Саратовская 29 и линии с межсортовым замещением хромосом S29(YP 4D*7A). В этой линии хромосома 4D сорта Саратовская 29 полностью замещена на хромосому 4D сорта Yanetzki Probat (YP), а в хромосоме 7A Саратовской 29 присутствует фрагмент соответствующей хромосомы сорта Yanetzki Probat. Этот фрагмент несет рецессивные аллели *pc-A1*, *rc-A1*, *pls-A1*, *plb-A1*. Из числа рекомбинантных линий мы отобрали по генотипу линию S29/YP 140, которая унаследовала хромосому 4D от сорта Саратовская 29, а 7A от S29(YP 4D*7A) – то есть в хромосоме 7A присутствовал фрагмент от YP, фланкируемый микросателлитными маркерами *Xgwm0060* и *Xgwm0748* (рис. 8). При анализе растений F₂, полученных от скрещивания этой линии и линий с генотипом *pp-D1pp-D1Pp3Pp3*, наличие вставки от YP устанавливалось с помощью микросателлитных маркеров, локализованных в хромосоме 7A. Присутствие вставок, несущих доминантные аллели *Pp3* в хромосоме 2A, определялось с помощью микросателлитных маркеров из данной хромосомы. В результате отобранные линии, несущие в хромосоме 7A

вставку от YP, а в хромосоме 2A вставку от Purple или Purple Feed (сорто-доноров доминантных аллелей *Pp3*), имели неокрашенный перикарп. Это послужило доказательством присутствия гена *Pp-A1* в хромосоме 7AS Саратовской 29 в интервале между маркерами *Xgwm0060* и *Xgwm0748*.

Ранее гены *Pp-1* были обнаружены только в геномах В и D, ведущих свое происхождение от рода *Aegilops*, а ген *Pp3* – только в геноме А, происходящем от диплоидного вида рода *Triticum* (Khlestkina et al., 2010; Tereshchenko et al., 2012). Считалось, что различное происхождение *Pp-1* и *Pp3* объясняет тот факт, что фиолетовая окраска зерна встречается только у полиплоидных пшениц, в геноме которых объединяются вместе субгеномы А и В или А, В и D (Tereshchenko et al., 2012). Однако, в настоящей работе доказано присутствие в геноме А пшеницы гена *Pp-A1*, то есть теоретически диплоидные виды с геномом А могут нести доминантные аллели *Pp-A1* и *Pp3* (Gordeeva et al., 2014). Возможно, у образцов диплоидной пшеницы не отмечалось наличие пигментации в силу очень слабого ее проявления из-за низкой функциональной активности гена *Pp-A1*.

Изучение гена *Pp-A1* позволило уточнить генотипы не только вновь полученных линий, но и линий/ сортов, используемых в скрещиваниях в качестве родительских. В связи с этим линиям были присвоены уточненные названия для удобства их использования в совокупности созданного набора изогенных линий на основе сорта Саратовская 29: линия S29/YP 140 обозначена как $i:S29pp-A1pp-D1pp3$; Саратовская 29 – $i:S29Pp-A1pp-D1pp$; линия $i:S29Pp1Pp2^{PF}$ – $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}$; линия $i:S29Pp1Pp3^P$ – $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P$ (табл. 5; Gordeeva et al., 2014).

Таким образом, к настоящему моменту идентифицирован полный набор гомеологичных генов *Pp-1* (*Pp-A1*, *Pp-B1*, *Pp-D1*). В то же время для гена *Pp3*, локализованного в хромосоме 2A (Dobrovolskaya et al., 2006), гомеологичные копии в хромосомах 2B и 2D пока не выявлены.

4.3. Новые изогенные линии как удобная генетическая модель

Почти изогенные линии пшеницы в настоящее время широко используются в сравнительных транскриптомных, протеомных и метаболомных исследованиях с целью выявления генов и их продуктов, вовлеченных в формирование того или иного признака (Dyck and Samborski 1968; Carver et al. 1993; Pumphrey et al. 2007; Hulbert et al. 2007; Bolton et al. 2008; Houde and Diallo 2008; Hamzehzarghani et al., 2008; Jia et al. 2009; Manickavelu et al. 2010; Gunnaiah et al., 2012), а также для изучения функциональной роли отдельных генов (Himi et al., 2005; Khlestkina, 2010в; Tereshchenko et al., 2013). Так, например, Hamzehzarghani et al. (2008) и Gunnaiah et al. (2012) при использовании изогенных линий, отличающихся устойчивостью к фузариозу колоса, описали генетические и метаболомные сети, вовлеченные в формирование устойчивости к данному заболеванию.

С помощью изогенных линий было показано, что гены, контролирующие антоциановую пигментацию различных органов пшеницы, вероятно, кодируют транскрипционные факторы, необходимые для активации структурных генов биосинтеза антоцианов в соответствующих органах (Tereshchenko et al., 2013), а гены *R-1* выполняют аналогичную функцию в отношении структурных генов биосинтеза проантоцианидинов (Himi et al., 2005).

С помощью полученного в настоящей работе набора почти изогенных линий, маркированных различными комбинациями аллелей генов *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*, изучена функциональная роль отдельных генов *Pp*. А также показано, что синтез антоцианов в перикарпе зерна пшеницы запускается благодаря активации ключевого гена биосинтеза антоцианов *F3h* с помощью совместного действия генов *Pp-1* и *Pp3*. По отдельности эти гены не могут активировать транскрипцию *F3h* в перикарпе, тогда как для активации других генов биосинтеза антоцианов может быть достаточно одного из доминантных генов *Pp* (Gordeeva et al., 2014). Кроме того, впервые установлено, что между

генами *Pp* существует взаимная регуляция: *Pp-D1* может вызывать частичную супрессию *Pp3* (Shoeva et al., 2014в).

Полученные линии могут применяться для последующего изучения тонкой регуляции биосинтеза антоцианов у пшеницы, а также использоваться в серии дальнейших физиологических экспериментов, направленных на выявление взаимосвязи между синтезом антоцианов в перикарпе зерна пшеницы и устойчивостью к различным факторам биотического и абиотического стресса. В настоящей работе показано, что у линий, несущих доминантные аллели *Pp-D1* и *Pp3*, относительный уровень антоцианов в зерне в 53-75 раз выше по сравнению с линиями (рис. 13), в которых хотя бы один из этих генов находится в рецессивном состоянии. Известна роль антоциановых соединений в противодействии засухе, холоду и другим экстремальным условиям, а также антимикробное действие данных соединений (Chalker-Scott, 1999; Khlestkina, 2013). Ввиду наблюдаемого существенного повышения содержания антоцианов в зерне линий $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}$ целесообразно дальнейшее сравнительное их исследование относительно дочерних полученных линий $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ в различных стрессовых условиях.

В перспективе, с использованием данных линий также целесообразно исследовать антиоксидантные свойства готовых продуктов, полученных из окрашенного и неокрашенного зерна, например, отрубей или отрубного хлеба. В конечном счете, полученные линии могут использоваться в качестве доноров определенных аллелей *Pp* в селекции. При этом процесс переноса изученных аллелей *Pp* может осуществляться с помощью перечисленных выше маркеров, рекомендованных на основе данных настоящей работы.

Кроме того, линии $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ могут использоваться для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp* в других линиях и сортах. Такая возможность была продемонстрирована в настоящей работе (рис. 12 гл. 3.2.). При этом в качестве тестерной использовалась линия $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$.

С неизвестным аллельным составом генов *Pp* была линия *i:S29Ra*, имеющая интенсивно окрашенное колеоптиле (ген *Rc-D1*, хромосома 7D), окрашенные ушки листового влагалища (*Ra-D1*, хромосома 7D) и неокрашенный перикарп. Растения в поколении F_1 от скрещивания *i:S29Pp-Alpp-D1Pp3^{PF}* с *i:S29Ra* имели интенсивную антоциановую пигментацию перикарпа, что указывало на присутствие в геноме линии *i:S29Ra* доминантного аллеля *Pp-D1* (Khlestkina et al., 2014).

4.4. Особенности регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе

Регуляция биосинтеза антоцианов относительно хорошо изучена у модельных видов растений (Mol et al., 1998), например, у *Arabidopsis thaliana* и *Zea mays* (Petroni and Tonelli, 2011), тогда как у видов с более сложным геномом, как у мягкой пшеницы, данный вопрос изучен слабо. Несмотря на то, что путь биосинтеза антоцианов является универсальным для всех высших растений, наблюдаются особенности его генетической регуляции, по которым отличаются однодольные и двудольные (Petroni and Tonelli, 2011), а также имеются отдельные видоспецифичные особенности (Shoeva and Khlestkina, 2014б). Таким образом, изучение характерных свойств регуляции биосинтеза антоцианов у мягкой пшеницы и сравнение полученных данных с другими видами, а также исследование особенностей тканеспецифичной регуляции является актуальной задачей. Для решения этой задачи весьма своевременным стало создание набора почти изогенных линий мягкой пшеницы, маркированных разными комбинациями рецессивных и доминантных аллелей генов *Pp* (табл. 5).

Ранее сравнительный анализ экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов в перикарпе у сорта Саратовская 29 и линий, несущих совместно два доминантных гена *Pp-D1* и *Pp3*, привел к выводу о регулирующей роли генов *Pp* в активации транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Tereshchenko et al., 2013). Однако эффект каждого из двух

комплементарных генов на экспрессию оставался неизвестным. В настоящей работе при использовании вновь созданных и родительских линий (табл. 5), несущих различные комбинации аллелей *Pp*, с помощью количественной ОТ-ПЦР был проанализирован уровень транскрипции структурных генов *Chi* и *F3h*, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза антоцианов халконфлаванонизомеразу и флаванон-3-гидроксилазу соответственно (рис. 14; Gordeeva et al., 2014). Установлено, что на различных этапах биосинтеза регуляция имеет свои характерные особенности. В частности, на стадии образования флаванонов из халконов, катализируемых ферментом СНІ, одновременное присутствие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3* не является обязательным. Каждый из этих двух генов по отдельности, и даже ген *Pp-A1*, отличающийся низкой функциональной активностью, способен активировать экспрессию гена *Chi* в клетках перикарпа (рис. 14). Более того, данный ген экспрессируется на фоновом уровне даже в перикарпе линии, у которой все три гена: *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*, – находятся в рецессивном состоянии (рис. 14). Ранее в промоторной области гена *Chi* помимо *cis*-регуляторных элементов, характерных для специфической регуляции биосинтеза антоцианов, были найдены также другие *cis*-регуляторные последовательности, которые могут быть ответственны за активацию транскрипции генов *Chi* вне зависимости от биосинтеза антоцианов (Shoeva et al., 2014a). Этим, а также участием фермента СНІ в биосинтезе нескольких классов флавоноидных соединений, а не только антоцианов (Запрометов, 1974; Бриттон, 1986; Winkel-Shirley, 2001) и может объясняться наблюдаемая экспрессия гена *Chi* у линии *i:S29pp-A1pp-D1pp3*.

В случае гена *F3h* обнаружен совсем иной характер и регуляция экспрессии. В клетках перикарпа для превращения флаванона нарингенина в дигидрофлавонолы, катализируемого ферментом F3H, имеет решающее значение одновременное присутствие двух комплементарных генов *Pp-D1* и *Pp3*. Совместно они активируют транскрипцию гена *F3h*, и тем самым

восстанавливают «прерванный» процесс биосинтеза антоцианов, и способствуют образованию пигмента в перикарпе (рис. 14).

Предполагается, что ген *Pp3* кодирует MYC-подобный, а *Pp-1* – MYB-подобный фактор активации транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Хлесткина, 2012), а на модельных растениях уже описана необходимость взаимодействия данных факторов для активации биосинтеза антоцианов на определенных этапах (Petroni and Tonelli, 2011). Причем на основе сравнения путей биосинтеза арабидопсиса и кукурузы был сделан вывод о принципиальном отличии между двудольными и однодольными. У двудольных этот комплекс необходим для активации только так называемых «поздних» генов биосинтеза антоцианов, *Dfr*, *Ans*, *Gt*; для функционирования «ранних» генов *Pal*, *Chs*, *Chi*, *F3h* достаточно только фактора MYB. У однодольных совместное действие транскрипционных факторов MYC и MYB требуется для активации всех генов биосинтеза антоцианов (Petroni and Tonelli, 2011). Пшеница также относится к однодольным, однако мы видим, что для экспрессии генов биосинтеза антоцианов в перикарпе требуется комплекс MYC+MYB только в случае работы гена *F3h*. Тогда как ген *Chi* экспрессируется при различных комбинациях рецессивных и доминантных аллелей генов, предположительно кодирующих транскрипционные факторы MYC и MYB (Gordeeva et al., 2014). Таким образом, особенности регуляции биосинтеза антоцианов у растений не исчерпываются различиями, найденными для модельных растений. Они сводятся, вероятно, к существенной вариации регуляторных сетей биосинтеза антоцианов у разных видов.

Для *A. thaliana* было показано, что его фермент F3H физически взаимодействует с халконсинтазой (CHS) и халконфлаванонизомеразой (CHI), как часть метаболического комплекса («метаболона») на эндоплазматическом ретикулуме (Owens et al., 2008). Эти ферменты кодируются так называемыми «ранними» генами биосинтеза антоцианов *Chs*, *Chi*, *F3h*. Возможно для своевременного формирования метаболона требуется согласованная

экспрессия генов, продукты которых образуют единый метаболический комплекс, что и наблюдается у арабидопсиса. Особенности внутриклеточной организации ферментативно-метаболического комплекса биосинтеза антоцианов у однодольных изучены недостаточно, у пшеницы они совершенно не изучены, поэтому трудно объяснить с чем связана особая роль регуляции именно на уровне превращения флаванонов в дигидрофлавонолы, катализируемом ферментом F3H.

Как уже было сказано выше, на основе сравнительного картирования у пшеницы, риса и кукурузы было выдвинуто предположение, что ген *Pp3* кодирует MYC-подобный, а *Pp-1* – MYB-подобный фактор активации транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Хлесткина, 2012). Недавно из генома мягкой пшеницы была выделена и охарактеризована нуклеотидная последовательность гена *TaMyc1*, который предполагается в качестве гена-функционального кандидата для *Pp3* (Shoeva et al., 2014в). С использованием полученного в настоящей работе набора изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, была изучена транскрипционная активность гена *TaMyc1* в перикарпе (рис. 15). Установлено, что присутствие доминантного аллеля *Pp3* связано с существенно более высоким уровнем транскрипции *TaMyc1* по сравнению с сестринскими линиями, несущими рецессивный аллель *pp3*. Это подтверждает предположение о том, что *TaMyc1* и есть ген *Pp3* на молекулярном уровне. По-видимому, основные функциональные различия между доминантным и рецессивным аллелями гена *Pp3* заключаются в различии уровней их экспрессии. Доминантный аллель *Pp3* характеризуется высокой активностью, а рецессивный аллель *pp3* экспрессируется на незначительном фоновом уровне (рис. 15).

Дальнейшее сравнение экспрессии *TaMyc1* в перикарпе изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, показало, что доминантный ген *Pp-D1* частично супрессирует ген *TaMyc1* (рис. 15), то есть по сути супрессирует ген *Pp3* (Shoeva et al., 2014в). Таким образом, впервые установлено, что между генами *Pp-D1* и *Pp3* существует взаимная регуляция.

Несмотря на то, что на модельных видах растений, хорошо показано взаимодействие самих белковых факторов МУС и МУВ (Mol et al., 1998; Petroni, Tonelli, 2011), о взаимной регуляции генов, кодирующих данные факторы, ничего не было известно.

Таким образом, впервые у растений, показано, что ген, кодирующий регуляторный МУВ-подобный фактор активации структурных генов биосинтеза антоцианов, способен регулировать транскрипцию другого регуляторного гена (кодирующего МУС-подобный фактор). Решающим для установления данного факта стало использование подходящих генетических моделей, созданных в настоящей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль флавоноидных соединений в защите растений от различных стрессовых воздействий, а также положительное их влияние на здоровье человека привлекают все более пристальное внимание исследователей. Известна взаимосвязь между биосинтезом флавоноидных пигментов в различных частях растения и воздействием патогенов, низких температур, засухи, засоления почв и некоторых других стрессовых факторов (Chalker-Scott 1999, Gordeeva et al., 2013; Khlestkina 2013). Чувствительность к изменению условий окружающей среды объясняется изменением экспрессии генов биосинтеза флавоноидов. Особенный интерес исследователей привлекают гены биосинтеза флавоноидных пигментов антоцианов, обладающих высоким антиоксидантным потенциалом, а именно гены, контролирующие окраску семян растений. Настоящая работа внесла вклад в понимание регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна основного хлебного злака – мягкой пшеницы.

Синтез и накопление антоцианов в клетках перикарпа (в первую очередь, в эпидермальном слое) приводит к появлению фиолетовой окраски зерновки пшеницы. Данный признак у мягкой пшеницы определяется наличием двух комплементарных доминантных генов: *Pp-D1* (в хромосоме 7D) и *Pp3* (в хромосоме 2A) (Tereshchenko et al., 2012). Функциональная роль каждого из этих генов до настоящей работы оставалась неизвестной. Исследования, направленные на изучение функциональной организации генов пшеницы, как правило, основываются на сравнительном исследовании генетических моделей: изогенных, интрогрессивных, замещенных и рекомбинантных линиях (Гордеева и др., 2009; Khlestkina, 2014). В настоящей работе для изучения функциональной роли генов *Pp*, контролирующих фиолетовую окраску зерна, был получен набор изогенных линий, содержащих различные комбинации доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp-D1*, *Pp3*, а также гена *Pp-A1*, впервые описанного в данной работе.

Для ускорения процесса создания желаемых генотипов использовался отбор линий с помощью молекулярных маркеров (микросателлитных) в комбинации с фенотипическим маркером (окраска колеоптиле). Основанием для использования данного признака в качестве маркера послужило, во-первых, его проявление на ранних стадиях развития растений, а во-вторых, расположение вблизи гена *Pp-D1* (2.5 сМ), установленное в настоящей работе (Tereshchenko et al., 2012; Гордеева, Хлесткина, 2013; Гордеева и др., 2014). В результате использования маркеров удалось существенно ускорить процесс создания линий с заданным набором генов и сократить объем исследуемого при создании этих линий материала.

Фиолетовая окраска зерна не описана у диплоидной пшеницы (геном АА), а отмечалась только у тетра- и гексаплоидных пшениц. Предполагалось, что это связано с происхождением комплементарных генов *Pp* от разных родов злаков: *Pp-1* от *Aegilops*, *Pp3* от *Triticum*, - совместное действие которых необходимо для активации биосинтеза антоцианов в перикарпе (Tereshchenko et al., 2012). Однако с помощью созданных линий удалось показать присутствие гена *Pp-A1* в геноме А пшеницы и получить линию, в которой проявлялось совместное действие локализованных в геноме А генов *Pp3* и *Pp-A1*. А именно, наблюдалась слабая антоциановая пигментация перикарпа. Возможно, собственно низкая функциональная активность гена *Pp-1* в А-геноме и объясняет тот факт, что у образцов диплоидной пшеницы не отмечалось наличие пигментации в силу очень слабого ее проявления (Гордеева и др., 2014).

Полученные линии могут использоваться для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp*. Так, например, при анализирующем скрещивании изогенной линии *i:S29Ra* с полученной нами изогенной линией *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* было доказано, что линия *i:S29Ra* несет в своем геноме доминантный аллель *Pp-D1*, проявивший свою активность в присутствии комплементарного гена *Pp3*. Другими

методами определить наличие данного гена не удавалось (Khlestkina et al., 2014).

Полученный в работе набор изогенных линий также представляет собой удобный инструмент для установления точной молекулярной функции каждого из генов *Pp*. Благодаря использованию изогенных линий нами было показано, что комплементарное взаимодействие доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3* является критическим для активации в перикарпе ключевого структурного гена биосинтеза антоцианов *F3h*, тогда как усиление транскрипции гена *Chi* происходит и при наличии отдельных доминантных генов *Pp* (Гордеева и др., 2014). Показано также, что относительный уровень антоцианов в зерне увеличивается в десятки раз только при комплементарном взаимодействии доминантных аллелей *Pp-D1* и *Pp3*. Таким образом, синтез антоцианов в перикарпе пшеницы запускается благодаря активации ключевого гена биосинтеза антоцианов *F3h*, за счет совместного действия генов *Pp-1* и *Pp3*.

Кроме того, при сравнительном исследовании полученных в работе изогенных линий подтверждено предположение о том, что на молекулярном уровне ген *Pp3* соответствует гену *TaMyc1*, и показано, что между генами *Pp* существует взаимная регуляция: *Pp-D1* может вызывать частичную супрессию *Pp3* (*TaMyc1*) (Schoeva et al., 2014в).

Полученные линии могут использоваться в качестве доноров определенных аллелей *Pp* при получении новых сортов пшеницы. Предложен список диагностических ДНК маркеров, рекомендуемых для использования в селекции пшеницы по признаку фиолетовой окраски зерна. Данные маркеры показывают четкие различия между родительскими линиями в 5% агарозном геле высокого разрешения, что упрощает процедуру анализа продуктов ПЦР, минуя дорогостоящий процесс секвенирования. К числу наиболее эффективных маркеров относятся: *Xgwm4204*, *Xgwm0817*, *Xgwm0445*, *Xgwm0312* (для селекции *Pp3*); *Xgwm0060*, *Xgwm0631*, *Xgwm0748* (*Pp-A1*); *Xgwm0044*, *Xgwm0111*, *Xgwm0437* (*Pp-D1*).

Кроме того, набор созданных в настоящей работе линий является подходящей моделью для сравнительного изучения антиоксидантного потенциала пищевых продуктов, полученных с использованием отрубей изогенных линий, отличающихся антоциановой пигментацией зерна. Этот набор линий также будет служить отличной моделью для серии дальнейших физиологических экспериментов по устойчивости пшеницы к различным факторам биотического и абиотического стресса.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на основе гибридизации и отбора растений с помощью микросателлитных маркеров получен набор изогенных линий пшеницы с различными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей в локусах *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp3*. Данный набор включает 6 новых линий, а также 4 родительские линии, генотип которых был уточнен в ходе настоящей работы.
2. В процессе создания изогенных линий выявлен новый ген, контролирующей антоциановую окраску перикарпа, *Pp-A1*, локализованный в коротком плече хромосомы 7A.
3. При использовании новой изогенной линии пшеницы *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* в анализирующем скрещивании было доказано, что линия *i:S29Ra* несет в своем геноме доминантный аллель *Pp-D1*. Таким образом, продемонстрирована возможность использования полученных линий для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp*.
4. Оценка относительного уровня антоцианов в зерне показала, что у линий, несущих доминантные аллели *Pp-D1* и *Pp3*, данный показатель в 53-75 раз выше по сравнению с линиями, в которых хотя бы один из этих генов находится в рецессивном состоянии.
5. С помощью количественной ПЦР на кДНК перикарпа полученных изогенных линий и исходных родительских форм установлено, что регуляторные гены *Pp-1* и *Pp3* не могут по отдельности активировать в перикарпе структурный ген *F3h*, тогда как усиление экспрессии гена *Chi* происходит и при наличии отдельных доминантных генов *Pp*.
6. Показано, что высокое содержание мРНК гена *TaMyc1* связано с присутствием доминантного аллеля гена *Pp3*, в то время как наличие доминантного гена *Pp-D1* вызывает его частичную супрессию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адонина И.Г., Сусолкина Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tausch. и их оценка на устойчивость к листовой ржавчине // Генетика. 2012. Т. 48. С. 488–494. Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Y.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust-resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. genetic material // Russ. J. Genet. 2012. V. 48. P. 404–409.
2. Арбузова В.С., Бадаева Е.Д., Ефремова Т.Т., Осадчая Т.С., Трубачеева Н.В., Добровольская О.Б. Цитогенетическое изучение голубозерной линии мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 // Генетика. 2012. Т. 48. С. 926–933. Arbuzova V.S., Badaeva E.D., Efremova T.T., Osadchaya T.S., Trubacheeva N.V., Dobrovolskaya O.B. A cytogenetic study of the blue-grain line of the common wheat cultivar Saratovskaya 29 // Russ. J. Genet. 2012. V. 48. P. 785–791.
3. Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н., Давоян Р.О., Давоян Э.Р., Карлов Г.И., Соловьев А.А., Дивашук М.Г., Майер Н.К., Дудников М.В., Мироненко Н.В., Баранова О.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавил. журн. генет. селекции. 2012. Т. 16. С. 37–43. Bepalova L.A., Vasilyev A.V., Ablova I.B., Filobok V.A., Khudokormova Zh.N., Davoyan R.O., Davoyan E.R., Karlov G.I., Soloviev A.A., Divashuk M.G., Mayer N.K., Dudnikov M.V., Mironenko N.V., Baranova O.A. The use of molecular markers in wheat breeding at the Lukyanenko Agricultural Research Institute // Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012. V. 2. P. 286–290.
4. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / пер. с англ. М.: Мир, 1986. 422 с. Britton G. The Biochemistry of Natural Pigments. London – New York: Cambridge University Press, Cambridge New Rochelle, 1986.

5. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.-Л.: Сельхозгис, 1935. 56 с. Vavilov N.I. The law of homologous series in hereditary variation. M.-L.: Sel'khozgiz, 1935. 56 p.
6. Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, НГУ. 2007. 127 с. Vasilyeva L.A. Statistical methods in biology, medicine and agriculture. Novosibirsk ICG SB RAS, Novosib. St. Univ. 2007. 127 p.
7. Гершензон С.М. Основы современной генетики. Киев: Наукова думка, 1979. 508 с. Gershenzon S.M. Foundations of modern genetics. Kiev: Naukova Dumka, 1979. 508 p.
8. Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Сиб. универс., 2002. 251 с. Goncharov N.P. Comparative genetics of wheat and their relatives. Novosibirsk: Sib. univers. Press, 2002. 251 p.
9. Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Салина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетика. 2009. Т. 45. С. 1616-1626. Gordeeva E.I., Leonova I.N., Kalinina N.P., Salina E.A., Budashkina E.B. Comparative cytological and molecular analysis of introgressive common wheat lines containing genetic material of *Triticum timopheevii* Zhur. // Russ. J. Genet. 2009. V. 45. P. 1616-1626.
10. Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Создание генетически маркированных линий мягкой пшеницы с различными комбинациями аллелей генов *Pp* (purple pericarp) // Тез. Конференции ВОГИС «Проблемы генетики и селекции». - 1-7 июля 2013. – Новосибирск, 2013. С.20. Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Creating genetically marked wheat lines with different combinations of alleles *Pp* (purple pericarp) // Proc. VOGIS conference "Problems of Genetics and Breeding." - July 1-7 2013. - Novosibirsk, 2013. P. 20.

11. Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Маркер-контролируемое получение и использование изогенных линий пшеницы, несущих различные комбинации аллелей *Pp* (Purple pericarp) // Тез. VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. 15-20 июня 2014. - Ростов-на-Дону, 2014. С. 149. Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-controlled preparation and use of isogenic lines of wheat carrying different combinations of alleles *Pp* (Purple pericarp) // Proc. VI The Congress VOGIS and assoc. genet. symp. 15-20 June 2014. - Rostov-na-Donu, 2014 P. 149.
12. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974. 214 с. Zaprometov M.N. Fundamentals of Biochemistry of phenolic compounds. M.: Vysshaya shkola, 1974. 214 p.
13. Коваль С.Ф. Каталог изогенных линий яровой мягкой пшеницы Новосибирская 67 и принципы их использования в эксперименте // Генетика. 1997. Т. 33. С. 1168–1173. Koval S.F. The catalog of near-isogenic lines of Novosibirskaya-67 common wheat and principles of their use in experiments // Russ. J. Genet. 1997. V. 33. P. 995–1000.
14. Леонова И.Н., Родер М.С., Будашкина Е.Б., Калинина Н.П., Салина Е.А. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1648–1655. Leonova I.N., Röder M.S., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Salina E.A. Molecular Analysis of Leaf Rust-Resistant Introgression Lines Obtained by Crossing of Hexaploid Wheat *Triticum aestivum* with Tetraploid Wheat *Triticum timopheevii* // Russ. J. Genet. 2002. V. 38. P. 1397–1403.
15. Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н.П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующей устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* x *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1652–1659. Leonova I.N., Röder M.S., Kalinina N.P., Budashkina E.B. Genetic analysis and localization

- of loci controlling leaf rust resistance of *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* introgression lines // Russ. J. Genet. 2008. V. 44. P. 1431–1437.
16. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавил. журн. генет. селекции. 2013. Т. 17. С. 314–325. Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression and gene pyramiding // Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2013. V. 3. P. 464–473.
 17. Малышев С.В., Урбанович О.Ю., Долматович Т.В., Картель Н.А. Микросателлитный (SSR) анализ белорусских сортов озимой пшеницы // Молекулярная и прикладная генетика. 2006. Т. 3. С. 80–84. Malyshev S.V., Urbanowicz O.Y., Dolmatovich T.V., Kartel N.A. Microsatellite (SSR) analysis of Belarusian winter wheat // Molekulyarnaya I prikladnaya genetika. 2006. V. 3 P. 80–84.
 18. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1967. 328 с. Rokitsky P.F. Biological statistics. Minsk: Vysshaya shkola, 1967. 328 p.
 19. Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Шумный В.К. Генотипирование отечественных сортов мягкой пшеницы с использованием микросателлитных (SSR) маркеров // С.-х. Биология. 2004. №. 5. С. 44–52. Khlestkina E.K., Salina E.A., Shumny V.K. (2004) Genotyping the native varieties of soft wheat by the microsatellite (SSR) markers // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. 2004. No. 5. P. 44–52.
 20. Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. 2006. Т. 42. С. 725–736. Khlestkina E.K., Salina E.A. SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat // Russ. J. Genet. 2006. V. 42 P. 585–594.
 21. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавил.

- журн. генет. селекции. 2011. Т. 15. С. 757-768. Khlestkina E.K. Molecular methods for analyzing the structure-function organization of genes and genomes in higher plants // Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012. V. 2. P. 243–251.
22. Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавил. журн. генет. селекции. 2012. Т. 16. С. 202–216. Khlestkina E.K. Genes Determining the Coloration of Different Organs in Wheat // Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2013. V.3 P. 54–65.
23. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавил. журн. генет. селекции. 2013. Т. 17. С. 1044–1054. Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding // Russ J Genet: Appl. Res. 2014. V. 4. P. 236–244.
24. Цитогенетика пшеницы и ее гибридов, М.: Наука, 1971. 288 с. Cytogenetics of wheat and its hybrids, M.: Nauka, 1971. 288 p.
25. Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Экспрессия гена *F3h* в различных органах пшеницы // Мол. Биол. 2013. Т. 47. С. 1028–1030. Shoeva, O.Y., Khlestkina, E.K. *F3h* gene expression in various organs of wheat // Mol. Biol. 2013. V. 47. P. 901–903.
26. Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 636с. Esau K. Plant anatomy. N.Y. – London – Sydney: John Wiley and Sons, Inc., 1965.
27. Abdel-Aal E.-S.M., Young J. C., Rabalski I. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. P. 4696–4704.
28. Abdel-Aal E.-S.M., Abou-Arab A.A., Gamel T.H., Hucl P., Young J. C., Rabalski I. Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 11171–11177.
29. Adhikari T.B., Cavaletto J., Dubcovsky J., Gieco J.O., Schlatter A.R., Goodwin S. Molecular mapping of the *Stb4* gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1198–1206.

30. Allan R.E., Vogel O.A. Monosomic Analysis of Red Seed Color in Wheat // *Crop Sci.* 1965. V. 5. P. 474–475.
31. Appleford N.E., Evans D.J., Lenton J.R., Gaskin P., Croker S.J., Devos K.M., Phillips A.L., Hedden P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat // *Planta.* 2006. V. 223. P. 568–582.
32. Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar ‘Saratovskaya 29’ // *Cereal Res. Commun.* 1998. V. 26. P. 39–46.
33. Arraiano L.S., Worland A.J., Ellerbrook C., Brown, J.K.M. Chromosomal location of a gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat ‘Synthetic 6x’ // *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 103. P. 758–764
34. Astadi I.R., Astuti M., Santoso U., Nugraheni P.S. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL) // *Food Chem.* 2009. V. 112. P. 659–663.
35. Bernhardt C., Lee M.M., Gonzalez A., Zhang F., Lloyd A., Schiefelbein J. The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root // *Development.* 2003. V. 130. P. 6431–6439.
36. Boisson M., Mondon K., Torney V., Nicot N., Laine A.-L., Bahrman N., Gouy A., Daniel-Vedele F., Hirel B., Sourdille P., Dardevet M., Ravel C., Le Gouis J. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110. P. 932–940.
37. Bolton F.E. Inheritance of blue aleurone and purple pericarp in hexaploid wheat // *Plant Breed. Abstr.* 1970. V. 40. P. 2684.
38. Bolton M.D., Kolmer J.A., Xu W.W., Garvin D.F. Lr34-Mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. V. 21. P. 1515–1527.

39. Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. Activation tagging identified a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 2383–2393.
40. Börner A., Korzun V., Worland A.J. Comparative genetic mapping of mutant loci affecting plant height and development in cereals // *Euphytica*. 1998. V. 100. P. 245–248.
41. Britsch L., Grisebach H. Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrid* // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 156 P. 569–577.
42. Buer C.S., Muday G.K. The *TRANSPARENT TESTA4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1191–1205.
43. Burr F.A., Burr B., Scheffler B.E., Blewitt M., Wienand U., Matz E.C. The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *rVb7* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 1249–1259.
44. Carver B.F., Whitmore W.E., Smith E.L., Bona L. Registration of four aluminum-tolerant winter wheat germplasms and two susceptible near-isolines // *Crop Sci.* 1993. V. 33. P. 1113–1114.
45. Cermeno M.C., Zeller F.J. Cytological investigations on the identity of the alien chromosome pair in several European blue-grained common wheat strains // *Proc. 7th Intern. Wheat Genetics Symp.* 1988. P. 227–240.
46. Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 1–9.
47. Chandler V.L., Radicella J.P., Robbins T.P., Chen J., Turks D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences // *Plant Cell*. 1989. V. 1. P. 1175–1183.
48. Chao S., Sharp P.J., Worland A.J., Warham E.J., Koebner R.M.D., Gale M.D. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 78. P. 495–504.

49. Chung H.S., Shin J.C. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo) // Food Chem. 2007. V. 104. P. 1670-1677.
50. Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z., Kearsey M.J., Werner P., Harrap D., Tapsell C., Liu H., Hedley P.E., Stein N., Schulte D., Steuernagel B., Marshall D.F., Thomas W.T.B., Ramsay L., Mackay I., Balding D.J., The AGOUEB Consortium, Waugh R., O'Sullivan D.M. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome // PNAS. 2010. V. 107. P. 21611–21616.
51. Cone K.C., Cocciolone S.M., Burr F.A., Burr B. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant // Plant Cell. 1993(a). V. 5. P. 1795–1805.
52. Cone K.C., Cocciolone S.M., Moehlenkamp C.A., Weber T., Drummond B.J., Tagliani L.A., Bowen B.A., Perrot G.H. Role of the regulatory gene *pl* in the photocontrol of maize anthocyanin pigmentation // Plant Cell. 1993(6). V. 5. P. 1807–1816.
53. Consonni G., Geuna F., Gavazzi G., Tonelli C. Molecular homology among members of the R gene family in maize // Plant J. 1993. V. 3. P. 335–346.
54. Cvorovic J., Tramer F., Granzotto M., Candussio L., Decorti G., Passamonti S. Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 501. P. 151–157.
55. Czemplin S., Stracke R., Weisshaar B., Cordon N., Harris N.N., Walker A.R., Robinson S.P., Bogs J. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries // Plant Physiol. 2009. V. 151. P. 1513–1530.
56. Debeaujon I., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 403–413.

57. Debeaujon I., Peeters A.J.M., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 853–871.
58. de Pascual-Teresa S., Moreno D.A., Garcia-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence // *Int. J. Mol. Sci*. 2010. V. 13. P. 1679–1703.
59. de Vetten N., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals // *Genes Dev*. 1997. V. 11. P. 1422–1434.
60. Dixon R.A., Liu C., Jun J.H. Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants // *Cur. Opin. Biotech*. 2013. V. 24. P. 329–335.
61. Dobrovolskaya O.B., Arbuzova V.S., Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 2006. V. 150. P. 355–364.
62. Dooner H.K., Robbins T.P., Jorgensen R.A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis // *Ann. Rev. Genet*. 1991. V. 25. P. 173–179.
63. Dubcovsky J., Luo M.C., Zhong G.Y., Bransteitter R., Desai A., Kilian A., Kleinhofs A., Dvorak J. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. // *Genetics*. 1996. V. 143. P. 983–999.
64. Dubos C., Le Gourrierec J., Baudry A., Lanet E., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Alboresi A., Weisshaar B., Lepiniec L. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2008. V. 55. P. 940–953.
65. Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis* // *Trends Plant Sci*. 2010. V. 15. P. 573–581.

66. Dyck P.L., Samborski D.J. Genetics of resistance to leaf rust in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakof and Centenario // *Can. J. Genet. Cytol.* 1968. V. 10. P. 7–17.
67. Dykes L., Rooney L.W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits // *Cereal Foods World.* 2007. V. 52. P. 105–111.
68. Ferre -D'Amare A.R., Pognonec P., Röder R.G., Burley S.K. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 180–189.
69. Freed R.D., Everson E.H., Ringlund K., Gullord M. Seed coat color in wheat and the relationship to seed dormancy at maturity // *Cereal Res. Commun.* 1976. V. 4. P. 147–149.
70. Flintham J.E., Gale M.D. Dormancy gene maps in homoeologous cereal genomes // *Proc. 7th Int. Symp. Pre-harvest Sprout. Cereals.* Osaka. Japan, 1995. P. 143–149.
71. Gagne S., Saucier C., Geny L. Composition and cellular localization of tannins in cabernet sauvignon skins during growth // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 9465–9471.
72. Gale M.D., Atkinson M.D., Chinoy C.N., Harcourt R.L., Jia J., Li Q.Y., Devos K.M. Genetic maps of hexaploid wheat // Li Z.S., Xin Z.Y. (Eds.) *Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp.* Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1995. P. 1333–1500.
73. Ganai M., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Varshney R.K., Tuberosa R. (Eds.) *Genomics-assisted crop improvement. Vol. 2. Genomics applications in crops.* The Netherlands: Springer, 2007. P. 1-24.
74. Gani A., Wani S.M., Masoodi F.A., Hameed G. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits // *Review. Food Proc. and Technol.* 2012. V. 3. P. 1–10.
75. Gill K.S., Lubbers E.L., Gill B.S., Raupp W.J. and Cox T.S. A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD) // *Genome.* 1991. V. 34. P. 362–374.

76. Goff S.A., Klein T.M., Roth B.A., Fromm M.E., Cone K.C., Radicella J.P., Chandler V.L. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulating genes into maize tissue // EMBO J. 1990. V. 9. P. 2517–2522.
77. Goff S.A., Cone K.C., Chandler V.L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins // Genes and Devel. 1992. V. 6. P. 864–875.
78. Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Llyod A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings // Plant J. 2008. V. 53. P. 814–827.
79. Goodman C.D., Casati P., Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1812–1826.
80. Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., E.K. Khlestkina E.K. Cold stress response of wheat genotypes having different *Rc* alleles // Cereal Res. Commun. 2013. V. 41. P. 519–526.
81. Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of *Pp* (*purple pericarp*) alleles // Euphytica. 2014. Under review.
82. Grassi D., Desideri G. and Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis // Rev. Nutrients. 2010. V. 2 P. 889–902.
83. Gunnaiah R., Kushalappa A.C., Duggavathi R., Fox S., Somers D.J. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum* // PLoS ONE. V. 7. P. e40695.
84. Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C., Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding // Plant Breed. 1999. V. 118. P. 369–390.
85. Hamzehzarghani H., Paranidharan V., Abu-Nada Y., Kushalappa A.C., Mamer O., Somers D. Metabolic profiling to discriminate wheat near isogenic lines,

- with quantitative trait loci at chromosome 2DL, varying in resistance to fusarium head blight // *Can. J. Plant Sci.* 2008. V. 88. P. 789–797.
86. Hardcastle A.C., Aucott L., Reid D.M., Macdonald H.M. Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population // *J. Bone Miner. Res.* 2011. V. 26. P. 941–947.
 87. Harborne J.B. and Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992 // *Phytochemistry*. 2000. V. 55. P. 481–504.
 88. Hartmann U., Sagasser M., Mehrtens F., Stracke R., Weisshaar B. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. P. 155–171.
 89. Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 735–747.
 90. Hichri I., Heppel S.C., Pillet J., Le'on C., Czemplak S., Delrot S., Lauvergeat V., Bogs J. The basic helix–loop–helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine // *Mol. Plant.* 2010. V. 3. P. 509–523.
 91. Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 2465–2483.
 92. Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 365–375.
 93. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome*. 2005. V. 48. P. 747–754.

94. Himi E., Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor // *Euphytica*. 2005. V. 143. P. 239–242.
95. Himi E., Osaka T., Noda K. 2006. Isolation and characterization of wheat ANS genes. GenBank, 2006. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=himi%20osaka%20noda&cmd=Search&db=nucore&QueryKey=4>]
96. Himi E., Maekawa M., Miura H., and Noda K. Development of PCR markers for *Tamyb10* related to *R-1*, red grain color gene in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011(a). V. 122. P. 1561–1576.
97. Himi E., Maekawa M., Noda K. Differential expression of three flavanone 3-hydroxylase genes in grains and coleoptiles of wheat // *Int. J. Plant Genom.* 2011(6). V. 11 P. ID369460.
98. Hirawan R., Diehl-Jones W., Beta T. Comparative evaluation of the antioxidant potential of infant cereals produced from purple wheat and red rice grains and LC-MS analysis of their anthocyanins // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 12330–12341.
99. Holton T.A., Cornish E.C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis // *Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 1071–1083.
100. Houde M., Diallo A.O. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. *BMC Genom.* 2008. V. 9. P. 400.
101. Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganai M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 105. P. 699–707.
102. Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pacheco MG, Bowden RL Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene Lr34/Yr18 // *Phytopath.* 2007. V. 97. P. 1083–1093.
103. Iqbal S., Bhangar M.I., Anwar F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan // *Food Chem.* 2005. V. 93 P. 265–272.

104. Jaakola L., Määttä K., Pirtillä A.M., Törrönen R., Kärenlampi S., Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 729–739.
105. Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley // *Hereditas.* 1993. V. 119. P. 187–204.
106. Jia H., Cho S., Muehlbauer G.J. Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying *Fusarium* head blight-resistant and -susceptible alleles // *Mol. Plant Microbe. Interact.* 2009. V. 22. P. 1366–1378.
107. Jin H., Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family // *Plant Mol. Biol.* 1999. V. 41. P. 577–585.
108. Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Arbuzova V.S., Salina E.A., Börner A. Comparative mapping of genes for glume colouration and pubescence in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 113. P. 801–807.
109. Khlestkina E.K., Röder M.S., Pshenichnikova T.A., Simonov A.V., Salina E.A., Börner A. Genes for anthocyanin pigmentation in wheat. P. review and microsatellite-based mapping // Verrity J.F., Abbington L.E. (Eds.) *Chromosome mapping research developments*. N.Y.: NOVA Sci. Publ. Inc., 2008(a). P. 155–175.
110. Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome - a case study in bread wheat // *BMC Plant Biol.* 2008(6). V. 8. P. 88.
111. Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes // *Cereal Res. Commun.* 2009(a). V. 37. P. 391–398.
112. Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Yu., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids // *Mol. Genet. Genom.* 2009(6). V. 282. P. 475–485.

113. Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.) // *Euphytica*. 2010(a). V. 171. P. 65–69.
114. Khlestkina E.K., Röder M.S., Pshenichnikova T.A., Börner A. Functional diversity at *Rc* (red coleoptile) locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Mol. Breed.* 2010(6). V. 25. P. 125–132.
115. Khlestkina E.K. Regulatory-target gene relationships in allopolyploid and hybrid genomes // In: Urbano KV (Ed) “Advanc. Genet. Res.”, NOVA Sci. Pub. Inc., USA, 2010. V. 3. P. 311–328.
116. Khlestkina E.K., Antonova E.V., Pershina L.A., Soloviev A.A., Badaeva E.D., Börner A., Salina E.A. Variability of *Rc* (red coleoptile) alleles in wheat and wheat-alien genetic stock collections // *Cereal Res. Commun.* 2011(a). V. 39. 465–474.
117. Khlestkina E.K., Salina E.A., Matthies I., Leonova I.N., Borner A., Roder M.S. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley // *Euphytica*. 2011(6). V. 179. P. 333–341.
118. Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeevs E.I. Myc-like family of transcription factors in wheat // *Abstr. The 12th Int. Wheat Genet. Symp. Yokogama, Japan, 8-14 September 2013(a)*. P. 6–15.
119. Khlestkina E.K., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A. Diversification of the duplicated *F3h* genes in Triticeae // *J. Mol. Evol.* 2013(6). V. 76 P. 261–266.
120. Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals // *Cereal. Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 185–198.
121. Khlestkina E.K., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line ‘i:S29Ra’ having intensive anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles // *Plant Breed.* 2014. V. 133. P. 454–458.

122. Khlestkina E.K. Current applications of wheat and wheat-alien precise genetic stocks // *Mol. Breed.* 2014. V. 34. P. 273–281.
123. Kitamura S. Transport of Flavonoids: From Cytosolic Synthesis to Vacuolar Accumulation // In *Science of Flavonoids*, Grotewold, E., (Ed.) Springer: Berlin, Germany, 2006. P. 123–146.
124. Knievel D.C., Abdel-Aal E.M., Rabalski I., Nakamura T., Hucl P. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J Cereal Sci.* 2009. V. 50 P. 113–120.
125. Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 236–242.
126. Koornneef M. Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis* // *Arabidopsis Inf. Serv.* 1990. V. 27. P. 1–4.
127. Kubasek W.L., Shirley B.W., McKillop A., Goodman H.M., Briggs W., Ausubel F.M. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings // *Plant Cell* 1992. V. 4. P. 1229–1236.
128. Kubo H., Peeters A.J.M., Aarts M.G.M., Pereira A, Koornneef M. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1217–1226.
129. Kuraparthi V., Sood S., Gill B.S. Targeted genomic mapping of a red seed color gene (*R-A1*) in wheat // *Crop Sci.* 2008. V. 48. P. 37–48.
130. Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg I. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // *Genomics* 1987. V. 1. P. 174–181.
131. Law C.N., Worland A.J. Intervarietal chromosome substitution lines in wheat – revisited // *Euphytica.* 1996. V. 89 P. 1–16.
132. Lazze M., Pizzala R., Savio M., Stivala L., Prosperi E., Bianchi L. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-

- hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells // *Mutat. Res.* 2003. V. 535. P. 103–115.
133. Lecas M., Brillouet, J.M. Cell-wall composition of grape berry skins // *Phytochemistry* 1994. V. 35. P. 1241–1243.
134. Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids // *Annu Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 405–430.
135. Leonova I., Börner A., Budashkina E., Kalinina N., Unger O., Röder M., Salina E. Identification of microsatellite markers for a leaf rust resistance gene introgressed into common wheat from *Triticum timopheevii* // *Plant. Breed.* 2004. V. 123. P. 93–95.
136. Li G., Zhu Y., Zhang Y., Lang J., Chen Y., Ling W. Estimated daily flavonoid and stilbene intake from fruits, vegetables, and nuts and associations with lipid profiles in Chinese adults // *J. Acad. Nutr. Diet.* 2013. V. 113. P. 786–794.
137. Li H.P., Liao Y.C. Isolation and characterization of two closely linked phenylalanine ammonia-lyase genes from wheat // *Yi. Chuan. Xue. Bao.* 2003. V. 30. P. 907–912.
138. Li J., Wei H., Hu X., Hu X., Lu B., Yang W. Locus *R-D1* conferring red-grain-color in synthetic derivative wheat Chuanmai 42 mapped with SSR markers // *Mol. Plant Breed.* 2010. V. 1. P. 16–20.
139. Li W.G., Zhang X.Y., WU Y.J., Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds // *Acta Pharm. Sci.* 2001. V. 22. P. 1117–1120.
140. Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V. 98. P. 226–233.
141. Liao Y.C., Li H.P., Kreuzaler F., Fischer R. Nucleotide sequence of one of two tandem genes encoding phenylalanine ammonia-lyase in *Triticum aestivum* // *Plant Physiol.* 1996. V. 112. P. 1398–1398.

142. Liu X.M., Smith C.M., Gill B.S., Tolmay V. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 102. P. 504–510.
143. Liu X.M., Smith C.M., Gill, B.S. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6* // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 104. P. 1042–1048.
144. Macdonald-Clarke C.J., Macdonald H.M. Dietary anthocyanidins and bone health // Burchhardt P. et al. (eds) *Nutritional influences on bone health.* Springer. London, 2013. P. 177–187.
145. Maniatis T., Fritsch E. F. Sambrook J. *Molecular cloning // A laboratory manual.* USA. N.Y.: Gold Spring Harb. Lab., 1982. 362 p.
146. Manickavelu A., Kawaura K., Oishi K., Shin-I.T., Kohara Y., Yahiaoui N., Keller B., Suzuki A., Yano K., Ogihara Y. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina* // *DNA Res.* 2010. V. 17. P. 211–222.
147. Markham K.R., Gould K.S., Winefield C.S., Mitchell K.A., Bloor S.J., Boase M.R. Anthocyanic vacuolar inclusions—Their nature and significance in flower colouration // *Phytochemistry.* 2000. V. 55. P. 327–336.
148. Martin C., Prescott A., Mackay S., Bartlett J., Vrijlandt E. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* // *Plant J.* 1991. V. 1. P. 37–49.
149. Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J., et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 1689–1703.
150. Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 2008. V. 55. P. 954–967.

151. Matsumoto H., Nakamura Y., Tachibanaki S., Kawamura S., Hirayama M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 3560–3563.
152. Matus J.T., Poupin M.J., Canon P., Bordeu E., Alcalde J.A., Arce-Johnson P. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // Plant Mol. Biol. 2010. V. 72. P. 607–620.
153. McIntosh R.A., Backer E.P. Inheritance of purple pericarp in wheat // Proc. Linnean Soc. 1967. V. 92. P. 204–208.
154. McIntosh R.A., Hart C.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. IX Int. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, 1998. V. 5. 235 p.
155. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R., Devos K.M. Catalogue of gene symbols for wheat. 2008. [<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>]
156. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013 [<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneCatalogueIntroduction.pdf>]
157. Metzger R.J., Silbaugh B.A. Location of genes for seed coat color in hexaploid wheat *Triticum aestivum* L. // Crop Sci. 1970. V. 10. P. 495–496.
158. Milbury P.E., Graf B., Curran-Celentano J.M., Blumberg J.B. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione-S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. V. 48. P. 2343–2349.
159. Miyamoto T., Everson E.H. Biochemical and physiological studies of wheat seed pigmentation // Agron. J. 1958. V. 50. P. 733-734.
160. Mol J., Grotewold E., Koes R. How genes paint flowers and seeds // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. P. 212–217.
161. Moos S.P., Mumm R.H. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 969–977.

162. Mueller L.A., Goodman C.D., Silady R.A., Walbot V. AN9, a petunia glutathione *S*-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein // *Plant Physiol.* 2000 V. 123 P. 1561–1570.
163. Munkvold J.D., Greene R.A., Bermudez-Kandianis C.E., La Rota C.M., Edwards H., Sorrells S.F., Dake T., Benscher D., Kantety R., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J., Akhunov E.D., Dvorak J., Miftahudin, Gustafson J.P., Pathan M.S., Nguyen H.T., Matthews D.E., Chao S., Lazo G.R., Hummel D.D., Anderson O.D., Anderson J.A., Gonzalez-Hernandez J.L., Peng J.H., Lapitan N., Qi L.L., Echalier B., Gill B.S., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Sandhu D., Erayman M., Gill K.S., McGuire P.E., Qualset C.O., Sorrells M.E. Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1 // *Genetics.* 2004. V. 168. P. 639–650.
164. Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques* // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P.1863–1878.
165. Nomura T., Ishihara A., Yanagita R.C., Endo T.R., Iwamura H. Three genomes differentially contribute to the biosynthesis of benzoxazinones in hexaploid wheat // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 102. P. 16490–16495.
166. Owens D.K., Crosby K.C., Runac J., Howard B. A., Winkel B.S.J. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β – hydroxylase // *Plant Physiol Biochem.* 2008. V. 46. P. 833–843.
167. Pumphrey M.O., Bernardo R., Anderson J.A. Validating the *Fhb1* QTL for *Fusarium* head blight resistance in nearisogenic wheat lines developed from breeding populations // *Crop Sci.* 2007. V. 47. P. 200–206.
168. Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* // *Genetics.* 2000. V. 156. P. 1349–1362.
169. Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene

- products and with structural similarities to transcriptional activators // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3553–3558.
170. Peer W.A., Murphy A.S. Flavonoids and auxin transport: Modulators or regulators? // *Trends Plant. Sci.* 2007. V. 12 P. 556–563.
171. Petroni K., Cominelli E., Consonni G., Gusmaroli G., Gavazzi G. Tonelli C. The developmental expression of the maize regulatory gene *Hopi* determines germination-dependent anthocyanin accumulation // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 323–336.
172. Petroni K., Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive Organs // *Plant Sci.* 2011. V. 181. P. 219–229.
173. Petrusa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 14950–14973.
174. Pirro M., Lupattelli G., Del Giorno R., Schillaci G., Berisha S., Mannarino M.R., Bagaglia F., Melis F., Mannarino E. Nutraceutical combination (red yeast rice, berberine and policosanols) improves aortic stiffness in low-moderate risk hypercholesterolemic patients // *Pharm. Nutrition.* 2013. V. 1 P. 73–77.
175. Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 191. P. 1001–1007.
176. Pojer E., Mattivi F., Johnson D., Stockley C.S. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health // A Review. – *Comp. Reviews in Food Sci. and Food Saf.* 2013. V. 12. P. 483–508.
177. Prior R.L., Wu X., Gu L., Hager T.J., Hager A., Howard L.R. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 647–53.
178. Prochazkova D., Bousova I., Wilhelmova N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids // *Fitoterapia.* 2011. V. 82. P. 513–523.

179. Procissi A., Dolfini S., Ronchi A., Tonelli C. Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1547–1557.
180. Qi L.L., Echalié B., Chao S., Lazo G.R., Butler G.E., Anderson O.D., Akhunov E.D., Dvořák J., Linkiewicz A.M., Ratnasiri A., Dubcovsky J., Bermudez-Kandianis C.E., Greene R.A., Kantety R., La Rota C.M., Munkvold J.D., Sorrells S.F., Sorrells M.E., Dilbirligi M., Sidhu D., Erayman M., Randhawa H.S., Sandhu D., Bondareva S.N., Gill K.S., Mahmoud A.A., Ma X.F., Miftahudin, Gustafson J.P., Conley E.J., Nduati V., Gonzalez-Hernandez J.L., Anderson J.A., Peng J.H., Lapitan N.L., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Pathan M.S., Zhang D.S., Nguyen H.T., Choi D.W., Fenton R.D., Close T.J., McGuire P.E., Qualset C.O., Gill B.S. A chromosome bin map of 16000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat // *Genetics*. 2004. V. 168. P. 701–712.
181. Quattrocchio F., Wing J.F., Leppen H.T.C., Mol J.N.M., Koes R.E. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes // *Plant Cell*. 1993. V. 5. P. 1497–1512.
182. Quattrocchio F., Wing J.F., van der Woude K., Mol J.N.M., Koes R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes // *Plant J*. 1998. V. 13. P. 475–488.
183. Quattrocchio F., Wing J., van der Woude K., Souer E., de Vetten N., Mol J., Koes R. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 1433–1444.
184. Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix–loop–helix transcription factors of the anthocyanin pathway // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1274–1291.

185. Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. The regulation of flavonoid biosynthesis // Grotewold P.E. (Ed.) The science of flavonoids. N.Y.: Springer, 2008. P. 97–122.
186. Röder M.S., Plaschke J., Koenig S.U., Börner A., Sorrells M.E. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 246. P. 327–333
187. Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. 1998. V. 149. P. 2007–2023.
188. Romero I., Fuertes A., Benito M.J., Malpica J.M., Leyva A., Paz-Ares J. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 1998. V. 14. P. 273–284.
189. Salina E., Börner A., Leonova I., Korzun V., Laikova L., Maystrenko O., Röder M.S. Microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum* // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 686–689.
190. Sasaki R., Nishimura N., Hoshino H., Isa Y., Kadowaki M., Ichi T., Tanaka A. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice // Biochem. Pharm. . 2007. V. 74. P. 1619–1627.
191. Saslowsky D. E., Warek U., Winkel B.S.J. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 23735–23740.
192. Schwinn K., Venail J., Shang Y., Mackay S., Alm V., Butelli E., Oyama R., Bailey P., Davies K., Martin C. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum* // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 831–851.
193. Sears E.R. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. II. Additional chromosomal aberrations in *Triticum vulgare* // Genetics. 1944. V. 29. P. 232–246.
194. Sears E.R. Isochromosomes and telocentrics in *Triticum vulgare* // Genetics. 1946. V. 31. P. 229–230.

195. Sears E.R. The aneuploids of common wheat // Univ Mo Agr Sta Res Bul. 1954. V. 572. P. 1–59.
196. Selinger D.A., Chandler V.L. Major recent and independent changes in the levels and patterns of expression have occurred at the b gene, a regulatory locus in maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. V. 96. P. 15007–15012.
197. Simoes C., Albarello N., de Castro T.C., Mansur E. Production of anthocyanins by plant cell and tissue culture strategies // Biotechnol. Prod. Plant Secondary Metab. Chapter 5, 2012. P. 67–86.
198. Simon M.R., Khlestkina E.K., Castillo N.S., Börner A. Mapping quantitative resistance to septoria tritici blotch in spelt wheat // Eur. J. Plant Pathol. 2010. V. 128. P. 317–324.
199. Shirley B.W., Hanley S., Goodman H.M. Effect of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 333–347.
200. Shirley B.W., Kubasek W.L., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel F.M., Goodman H.M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis // Plant J. 1995. V. 8. P. 659–671.
201. Shirley B.W. Flavonoids in seeds and grains: Physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis // Seed Sci. Res. 1998. V. 8. P. 415–422.
202. Shitsukawa N., Tahira C., Kassai K., Hirabayashi C., Shimizu T., Takumi S., Mochida K., Kawaura K., Ogihara Y., Murai K. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1723–1737.
203. Shoeva O.Y., Khlestkina E.K., Berges H., Salina E.A. The homoeologous genes encoding chalcone-flavanone isomerase in *Triticum aestivum* L.: structural characterization and expression in different parts of wheat plant // Gene. 2014(a). V. 538. P. 334–341

204. Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. The specific features of anthocyanin biosynthesis regulation in wheat // Nasuda S., Takumi S., Matsuoka Y. (Eds) Wheat genetics: from genome to field. Japan: Springer. 2014(6). In Press.
205. Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in wheat pericarp // *Molecules*. 2014(8). In Press.
206. Singh K., Ghai M., Garg M., Chhuneja P., Kaur P., Schnurbusch T., Keller B., Dhaliwal H.S. An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115. P. 301–312.
207. Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. The WD repeat: a common architecture for diverse functions // *Trends in Biochem. Sci.* 1999. V. 24. P. 181–185.
208. Somers D.J. Molecular marker systems and the reevaluation for cereal genetics // *Cereal Genomics*. Gupta P.K., Varshney R.K. (eds). Netherlands: KluwerAcad. Publ., 2004. P. 19–34.
209. Somers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1105–1114.
210. Sourdille P., Singh S., Cadalen T., Brown-Guedira G.L., Gay G., Qi L., Gill B.S., Dufour P., Murigneux A., Bernard M. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Funct. Integr. Genomics*. 2004. V. 4. P. 12–25.
211. Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix–loop–helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1619–1631.
212. Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2121–2135.

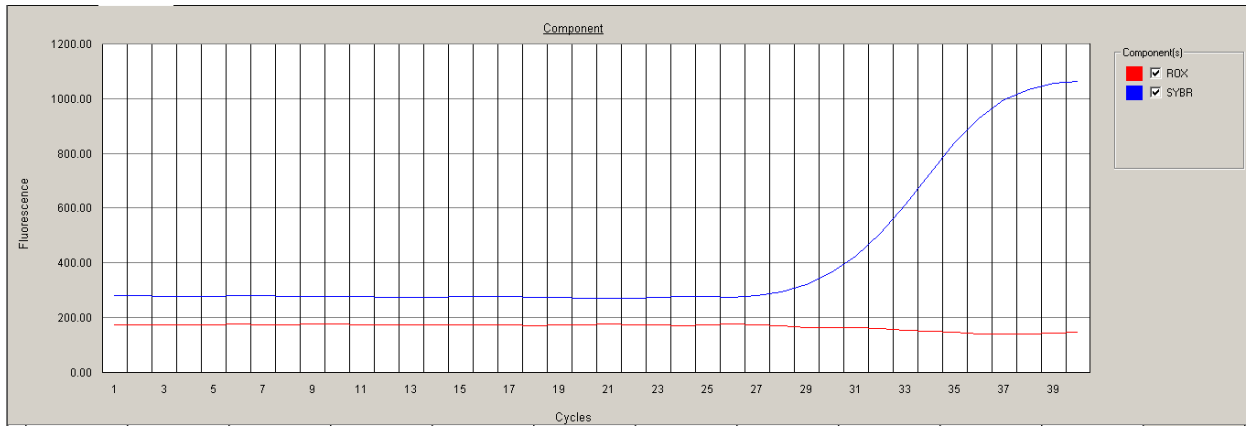
213. Stafford H.A. Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C₆-C₃ phenolic compounds and lignins in higher plants // Rec. Adv. Phytochem. 1974. V. 8. P. 53–79.
214. Stracke R., Werber M., Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* // Current Opin. Plant Biol. 2001. V. 4. P. 447–456.
215. Stushnoff C, Ducreux LJ, Hancock RD, et al. Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene–metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. // J. Exp. Botany. 2010. V. 61. P. 1225–1238.
216. Syed Jaafar S., Baron J., Siebenhandl-ehn S., Rosenau T., Bohmdorfer S., Grausgruber H. Increased anthocyanin content in purple pericarp x blue aleurone wheat crosses // Plant Breeding. 2013. V.132. P. 546–552.
217. Taylor L.P., Briggs W.R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings // Plant Cell. 1990. V. 2. P. 115–127.
218. Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S., Börner A., Salina, E.A., Khlestkina E.K., The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat // Cereal Res. Commun. 2012. V. 40. P. 334–341.
219. Tereshchenko O.Y., Arbuzova V.S., Khlestkina E.K. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes // J. Cereal Sci. 2013. V. 57. P. 10–13.
220. Timonova E.M., Leonova I.N., Röder M.S., Salina E. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome // Mol Breed. 2013. V. 31. P. 123–136.
221. Toledo-Ortiz G., Huq E., Quail P.H. The Arabidopsis basic/ helix–loop–helix transcription factor family // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1749–1770.
222. Trojan V., Musilova M., Vyhnánek T., Klejdus B., Hanáček P., Havel L. Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis // J. Cereal Sci. 2014. V. 59. P. 48–55.

223. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-*O*-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice // *J. Nutr.* 2003. V. 133. P. 2125–2130.
224. Van Nocker S., Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function // *BMC Genomics.* 2003. V. 4. P. 50.
225. Van Zandt M.C., Sibley E.O., McCann E.E., Combs K.J., Flam B., Sawicki D.R. Design and synthesis of highly potent and selective (2-arylcarbamoxyphenoxy)-acetic acid inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications // *Bioorgan. Med. Chemistry.* 2004. V.12. P. 5661–5675.
226. Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1337–1350.
227. Wang D., Zou T., Yang Y., Yan X., Ling W. Cyanidin-3-*O*- β -glucoside with the aid of its metabolite protocatechuic acid reduces monocyte infiltration in apolipoprotein E-deficient mice // *Biochem. Pharm.* 2011. V. 82. P. 713–719.
228. Wang J., Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-active RAW 2647 macrophages // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 850–857.
229. Wang Q, Han P, Zhang M, Xia M, Zhu H, Ma J, Hou M, Tang Z, Ling W. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2007. V. 16. P. 295–301.
230. Winkel B.S.J. The Biosynthesis of Flavonoids // Grotewold E. (Ed.) *The science of flavonoids.* N.Y.: Springer, 2008. P. 71–96.

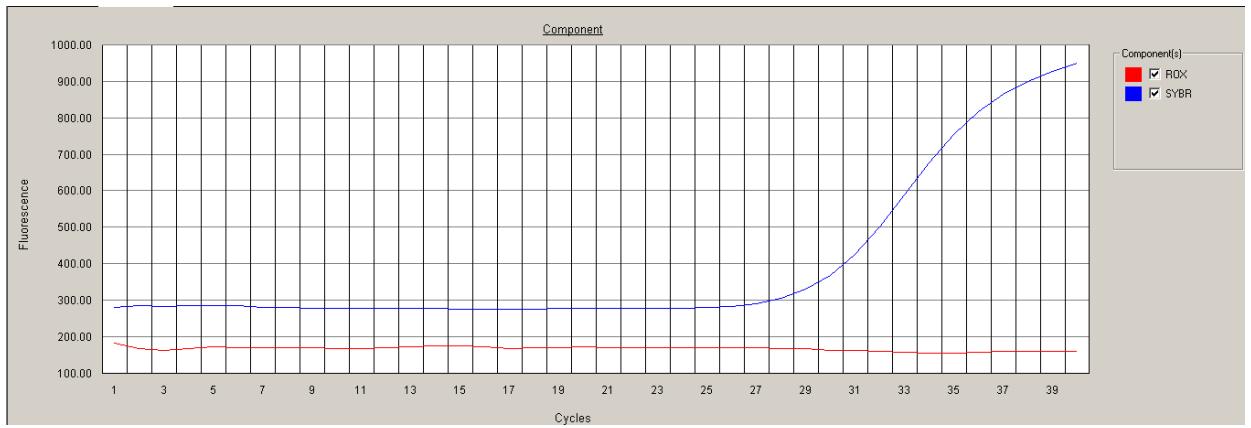
231. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 485–493.
232. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // *Cur. Op. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 218–223.
233. Xia X., Ling W., Ma J., Xia M., Hou M., Wang Q., Zhu H., Tang Z. An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Deficient Mice // *J. Nutr.* 2006. V. 136. P. 2220–2225.
234. Yang G., Li B., Gao J., Liu J., Zhao X., Zheng Q., Tong Y., Li Z. Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-Hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway // *J. Integr. Plant Biol. (Acta Bot. Sin.)*. 2004. V. 46. P. 588–594.
235. Yawadio R., Tanimori S., Morita N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice and their aldose reductase inhibitory activities // *Food Chemistry*. 2007. V. 101. P. 1616–1625.
236. Yazaki K. Transporters of secondary metabolites // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 301–307.
237. Zeven A.C. The genetics of auricle colour of wheat (*Triticum aestivum* L.) – a review // *Euphytica*. 1985. V. 34. P. 233–236.
238. Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review // *Euphytica*. 1991. V. 56. P. 243–258.
239. Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne T., Llyod A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis // *Development*. 2003. V. 130. P. 4859–4869.
240. Zheng Q., Li B., Mu S. et al. Physical mapping of blue-grained gene(s) from *Thinopyrum ponticum* by GISH and FISH in a set of translocation lines with different seed colors in wheat // *Genome*. 2006. V. 49. P. 1109–1114.

ПРИЛОЖЕНИЕ

А



Б



В

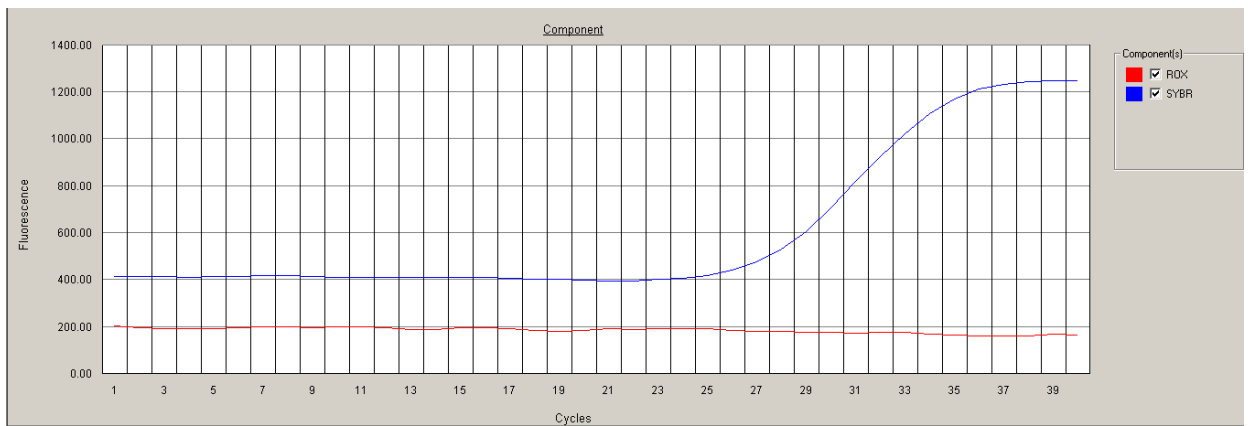


Рис. 1. Графики накопления продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к гену *F3h-1*(А), *Chi* (Б), *Mus1* (В). По оси абсцисс указан номер цикла ПЦР, по оси ординат – единицы флуоресценции.

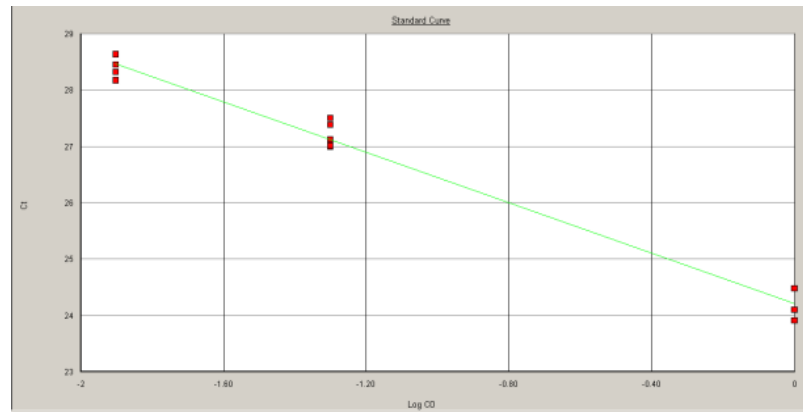


Рис. 2. График зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц для ОТ-ПЦР с праймерами к гену *F3h-1*. По оси абсцисс указаны единицы флуоресценции, по оси ординат – номер цикла. Точки соответствуют стандартным образцам, полученным с помощью последовательных разведений контрольного образца.

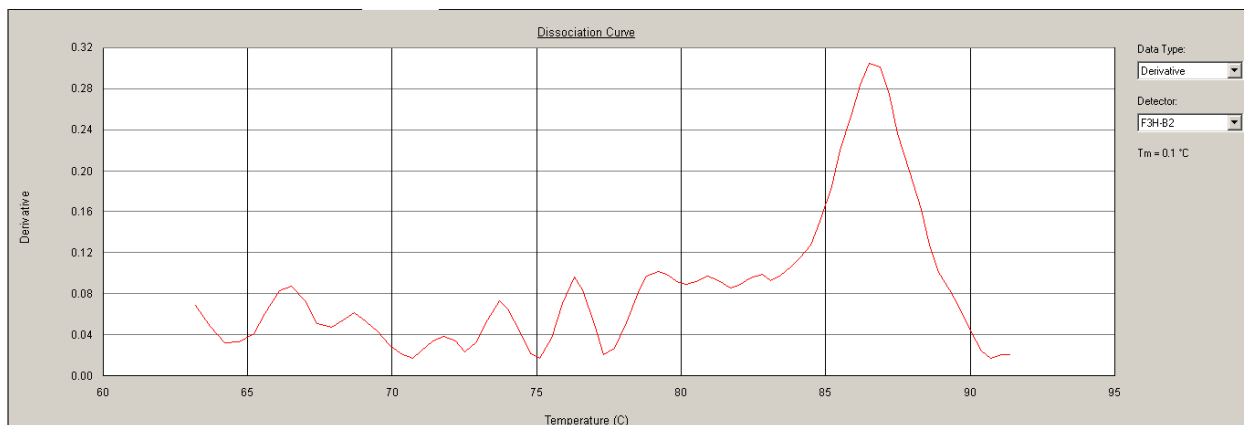


Рис. 3. Кривые плавления продукта ОТ-ПЦР с праймерами к гену *F3h-1*. По оси абсцисс указана температура в °С, а по оси ординат – единицы флуоресценции. Каждый график имеет только один пик, соответствующий ожидаемому продукту ПЦР; дополнительный пик в области более низкой температуры плавления, соответствующий димерам праймеров, не выявлен.

Таблица 1. Оценка значимости различий (*U*-test) между содержанием антоцианов в зернах восковой спелости (OD_{530}) почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple Feed.

	i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIpp3	i:S29pp-AIpp-DIpp3
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}		$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}			$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIpp3				$p \leq 0.05$

Таблица 2. Оценка значимости различий (*U*-test) между содержанием антоцианов в зернах восковой спелости (OD_{530}) почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple.

	i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIpp3	i:S29pp-AIpp-DIpp3
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}		$p > 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}			$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIpp3				$p \leq 0.05$

Таблица 3. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *Chi* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple Feed.

	i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^P	i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIpp3	i:S29pp-AIpp-DIpp3
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}		$p > 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}			$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIpp3				$p \leq 0.05$

Таблица 4. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *Chi* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple.

	i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^P	i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^P	i:S29Pp-A1pp-D1pp3	i:S29pp-A1pp-D1pp3
i:S29Pp-AIPp-D1Pp3 ^P	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^P		$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^P			$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1pp3				$p \leq 0.05$

Таблица 5. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *F3h-1* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple Feed.

	i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^{PF}	i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^{PF}	i:S29Pp-A1pp-D1pp3	i:S29pp-A1pp-D1pp3
i:S29Pp-AIPp-D1Pp3 ^{PF}	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^{PF}		$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^{PF}			$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1pp3				$p > 0.05$

Таблица 6. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *F3h-1* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple.

	i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^P	i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^P	i:S29Pp-A1pp-D1pp3	i:S29pp-A1pp-D1pp3
i:S29Pp-AIPp-D1Pp3 ^P	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-D1pp3 ^P		$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1Pp3 ^P			$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-A1pp-D1pp3				$p > 0.05$

Таблица 7. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *TaMyc1* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple Feed.

	i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}	i:S29Pp-AIpp-DIpp3	i:S29pp-AIpp-DIpp3
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^{PF}		$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^{PF}			$p > 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIpp3				$p \leq 0.05$

Таблица 8. Оценка значимости различий (*U*-test) между уровнем экспрессии гена *TaMyc1* в перикарпе почти изогенных линий в наборе линий, наследующих доминантные гены *Pp* от *T. aestivum* Purple.

	i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^P	i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^P	i:S29Pp-AIpp-DIpp3	i:S29pp-AIpp-DIpp3
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^P	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIPp-DIPp3 ^P		$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIPp3 ^P			$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
i:S29Pp-AIpp-DIpp3				$p \leq 0.05$