

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)**

На правах рукописи

ГЛАГОЛЕВА АНАСТАСИЯ ЮРЬЕВНА

**Идентификация и анализ генов биосинтеза
меланина в колосе ячменя (*Hordeum vulgare* L.)**

1.5.7. – генетика.

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Шоева Олеся Юрьевна

Новосибирск, 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Типы пигментов растений и генетическая регуляция их биосинтеза	16
1.1.1 Биосинтез фенилпропаноидов.....	17
1.1.2 Регуляция пути биосинтеза фенилпропаноидов	20
1.1.3 Пигменты флавоноидной природы в зерновке ячменя.....	24
1.2. Меланины растений	27
1.2.1 Физико-химические методы выделения меланина	28
1.2.2 Функции меланина растений	29
1.2.3 Меланины в колосе ячменя.....	32
1.2.3.1. Признак черной окраски колоса ячменя.....	32
1.2.3.2. Картирование локуса <i>Vlp1</i>	33
1.2.3.3. Влияние гена <i>Vlp1</i> на синтез других пигментов в зерновке ячменя	35
1.2.3.3.1 Влияние гена <i>Vlp1</i> на синтез антоцианов	35
1.2.3.3.2 Взаимодействие меланина и хлорофилла	38
1.3. Полифенолоксидазы растений	43
1.3.1 Структура и функции полифенолоксидаз	43
1.3.2 Гены полифенолоксидаз растений	47
1.3.3 Роль полифенолоксидаз в синтезе меланина	49
Заключение.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53

2.1	Растительный материал, выделение ДНК	53
2.2	Фенотипирование образцов с темной окраской зерновки.....	54
2.3	Разработка ПЦР-маркеров и генотипирование	55
2.3.1	<i>In silico</i> анализ нуклеотидных последовательностей и разработка ПЦР-маркеров.....	55
2.3.2	Генотипирование коллекций и картирование гена <i>Blp1</i>	55
2.4	<i>In silico</i> анализ последовательностей генов	57
2.5	Анализ популяций F ₂ , несущих рецессивные аллели генов <i>Pro</i>	57
2.6	Анализ экспрессии	58
2.6.1	Выделение РНК	58
2.6.2	ПЦР в режиме реального времени	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....		60
3.1	Определение гена-кандидата на роль гена <i>Blp1</i> , контролирующего признак черной окраски колоса ячменя.	60
3.1.1	<i>In silico</i> анализ полиморфных участков в локусе <i>Blp1</i> и разработка ПЦР-маркеров.....	60
3.1.2	Подбор и тестирование растительного материала для ассоциативного картирования.....	62
3.1.3	Генотипирование коллекции и поиск ассоциаций с черной окраской колоса	63
3.2	Анализ гена HORVU1Hr1G086780 – кандидата на роль <i>Blp1</i>	65
3.2.1	Определение структуры и функции гена.....	65
3.2.2	Секвенирование и поиск аллелей гена в различных образцах коллекции ячменя	66
3.2.3	Анализ экспрессии гена-кандидата в почти-изогенных линиях ячменя	68

3.3 Анализ экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов в почти-изогенных линиях ячменя, контрастных по наличию меланиновой окраски зерновки	70
3.4 Анализ семейства генов полифенолоксидаз (<i>Ppo</i>) ячменя	72
3.4.1. Идентификация генов семейства полифенолоксидаз ячменя и их структурная организация	72
3.4.2 Кластерный анализ генов <i>Ppo</i>	73
3.4.3 Сравнительный анализ экспрессии генов <i>Ppo</i> в колосе почти-изогенных линий ячменя	77
3.4.4 Проверка участия гена <i>Ppo2</i> в синтезе меланина	79
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	82
4.1 Выделение и анализ гена-кандидата на роль <i>Vlp1</i>	82
4.1.1 Ассоциативное картирование гена в локусе <i>Vlp1</i>	82
4.1.2 Анализ структуры и функции гена-кандидата на роль <i>Vlp1</i> ..	83
4.2 Идентификация других генов-участников меланогенеза у ячменя	86
4.2.1 Гены пути биосинтеза фенилпропаноидов	86
4.2.2 Гены семейства полифенолоксидаз (<i>Ppo</i>) ячменя и их роль в синтезе меланина	87
4.2.2.1 Анализ семейства генов <i>Ppo</i>	87
4.2.2.2 Участие <i>Ppo</i> в синтезе меланина	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97
ПРИЛОЖЕНИЯ	124

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

4CL – 4-coumarate CoA ligase, 4-кумарат КоА лигаза

AFLP – amplified fragment length polymorphism, полиморфизм длины амплифицированного фрагмента

ANR – anthocyanidin reductase, антоцианидинредуктаза

ANS – anthocyanidin synthase, антоцианидинсинтаза

Ant – anthocyanin-less, локусы ячменя, связанные с синтезом антоцианов

Bh4 – black hull 4, локус риса, связанный с черной окраской семян

bHLH – basic helix-loop-helix, основной спираль-петля-спираль домен

Blp1 - black lemma and pericarp 1, локус, связанный с черной окраской зерновки ячменя

Blx – non-blue aleurone xenia, гены, связанные с окраской алейронового слоя у ячменя

BSA – bulked segregant analysis, массовый сегрегантный анализ

C3'H – p-coumaroyl shikimate 3-hydroxylase, p-кумароилшикимат-3'-гидроксилаза

C4H – cinnamate 4-hydroxylase, циннамат-4-гидроксилаза

CAD – cinnamyl alcohol dehydrogenase, циннамилалкогольдегидрогеназа

CAPS – cleaved amplified polymorphic sequence, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

CCoAOMT – caffeoyl CoA O-methyltransferase, кофеил КоА о-метилтрансфераза

CCR – cinnamoyl CoA reductase, циннамоил КоА редуктаза

CHI – chalcone-flavanone isomerase, халконфлаванонизомераза

CHS – chalcone synthase, халконсинтаза

COMT – caffeic acid o-methyltransferase, о-метилтрансфераза кофейной кислоты

CSE – caffeoyl shikimate esterase, кофеоилшикиматэстераза

DFR – dihydroflavonol 4-reductase, дигидрофлавонол-4-редуктаза

EST - expressed sequence tag, короткие экспрессирующиеся последовательности

F3'5'H – flavonoid 3', 5'-hydroxylase, флавоноид-3', 5'-гидроксилаза

F3'H – flavonoid 3'-hydroxylase флавоноид-3'-гидроксилаза

F3H – flavanone 3-hydroxylase, флаванон-3-гидроксилаза

F5H – ferulate 5-hydroxylase, ферулат-5-гидроксилаза

FLS – flavonol synthase, флавонолсинтаза

FS – flavone synthase, флавонсинтаза

HCT — hydroxycinnamoyl CoA transferase, гидроксицинамоил КоА трансфераза

IFS – isoflavonoid synthase, изофлавонолсинтаза

InDel – insertion deletion, маркеры, выявляющие вставки или делеции в нуклеотидной последовательности

LAR – leucoanthocyanidin reductase, лейкоантоцианидинредуктаза

MYB – myeloblastosis, семейство ТФ растений

MYC – myelocytomatosis, семейство ТФ растений

NAC – семейство транскрипционных факторов растений

PAL – phenylalanine ammonia lyase, фенилаланинаммиаклиаза

PAP – purple acid phosphatase, фиолетовая кислая фосфатаза

Phr1 – phenol reaction 1, локус, связанный с фенольной реакцией

PPO – polyphenol oxidase, полифенолоксидаза

RILs – recombinant inbred lines, рекомбинантные инбредные линии

SLAF-seq – specific-locus amplified fragment sequencing, секвенирование локус-специфичных ампликонов

TAL – tyrosine ammonia lyase, тирозинаммиазиаза

WD40 – семейство ТФ растений, оканчивающихся дипептидом W-D (триптофан-аспарагиновая кислота)

НТР – нетранслируемые районы

ТФ – транскрипционный фактор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) является одной из наиболее возделываемых зерновых культур в мире и широко используется в качестве кормовой культуры, сырья для производства солода в пивоваренной промышленности и в качестве компонента рациона питания человека. Благодаря способности произрастать в широком диапазоне климатических условий, эта культура является незаменимой в тех географических регионах, где успешное возделывание других злаковых культур является невозможным (Newton et al., 2011). Высокая питательная ценность ячменя и стрессоустойчивость объясняют повышенный интерес к этой культуре как к источнику питания. Помимо основных питательных веществ, цельные зерна ячменя богаты пищевыми волокнами, индолами и фенольными соединениями, которые являются компонентами функционального питания для человека (Gangopadhyay et al., 2015; Ge et al., 2021).

Фенольные соединения, аккумулируемые в зерновке ячменя, относятся к вторичным метаболитам и участвуют в росте и развитии растений, а также их защите от неблагоприятных условий окружающей среды, таких как холод, засуха, УФ-излучение и инвазия патогенов (Brunetti et al., 2013; Ceccarelli et al., 1987; Grotewold, 2006; Sharma et al., 2019). Некоторые фенольные соединения являются пигментами и придают темную окраску оболочкам зерновки ячменя. Пигменты антоцианы, относящиеся к группе флавоноидов, накапливаясь в перикарпе и алейроновом слое зерновки, обуславливают фиолетовую и голубую окраску, соответственно. Другая группа полифенольных соединений – меланины, накапливаясь в перикарпе и цветковых чешуях, придают зерну ячменя коричневую или черную окраску. В отличие от пути биосинтеза антоцианов, генетический контроль биосинтеза меланинов у ячменя остается малоизученным. Считается, что меланины

являются продуктами ферментативного окисления и полимеризации фенолов и представляют собой плотные, химически инертные соединения, нерастворимые в воде и большинстве растворителей (Jana & Mukherjee, 2014; Nicolas et al., 1994). Показано, что растения с черной окраской оболочек семян обладают повышенной устойчивостью к действию патогенов по сравнению с неокрашенными растениями, являются более холодо- и засухоустойчивыми, что связано как с механической прочностью меланина, так и с его антиоксидантными свойствами (Ceccarelli et al., 1987; Choo et al., 2015; Jana & Mukherjee, 2014). Известно, что меланины растений являются продуктами окисления и полимеризации фенольных соединений при участии ферментов полифенолоксидаз (PPO). Данный процесс получил название «реакция ферментативного потемнения» и хорошо изучен при механическом разрушении тканей растений (Nicolas et al., 1994). Однако, в последнее время появляются данные об участии PPO в синтезе меланина и в неповрежденных тканях растений (Wan et al., 2016, Li et al., 2020, Wang et al., 2020).

У ячменя признак черной окраски колоса моногенно контролируется локусом *Blp1* (*Black lemma and pericarp*), картированным на длинном плече хромосомы 1Н (Costa et al., 2001). К настоящему моменту, локус *Blp1* сужен до района протяженностью 0,8 Mb, в котором предсказан 21 ген (Long et al., 2019), однако, до сих пор остается неизвестным, какой именно из этих генов ответственен за формирование признака.

В рамках данной работы были выделены и проанализированы гены, вовлеченные с биосинтез меланина в колосе ячменя. При помощи метода ассоциативного картирования был выявлен ген-кандидат на роль *Blp1*. Был проведен анализ экспрессии ключевых генов биосинтеза фенилпропаноидов в динамике созревания колоса, для изучения активности этого метаболического пути в процессе биосинтеза меланина. Помимо этого, изучение семейства генов PPO ячменя позволило установить их роль в формировании меланина в зерновке.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования является выявление и изучение генов, контролирующих синтез меланина в колосе ячменя.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установление гена-кандидата локуса *Blp1*, контролирующего признак черной окраски колоса ячменя;
2. Определение роли локуса *Blp1* в регуляции экспрессии генов пути биосинтеза фенилпропаноидов;
3. Анализ семейства генов полифенолоксидаз (PPO) ячменя и установление их роли в биосинтезе меланина.

Научная новизна работы

В ходе данной работы при помощи метода ассоциативного картирования был впервые определен кандидат на роль гена *Blp1*, моногенно контролирующего синтез меланина в цветковых чешуях и перикарпе ячменя. Было установлено, что данный ген кодирует сигнальный CLE-пептид из семейства CLAVATA. Был выявлен гаплотип, ассоциированный с присутствием меланина в зерновке ячменя, включающий девять совместно наследуемых полиморфизмов. Было предположено, что описанный гаплотип имеет монофилетическое происхождение и возник у дикого предка ячменя (*Hordeum spontaneum* Koch.).

При помощи сравнительного анализа экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов в почти-изогенной линии ячменя i:Vw*Blp1* и исходном сорте Bowman было показано, что данные гены являются наиболее транскрипционно активными в развивающемся колосе, однако на поздних стадиях созревания колоса в линии с меланином в зерновке (i:Vw*Blp1*) происходит вторичная активация генов *Pal*, *C4h*, *4Cl* и

C3'h, что было продемонстрировано впервые. Показана специфическая активация транскрипции гена *Comt* при синтезе меланина.

Были изучены два новых гена семейства полифенолоксидаз – *Ppo3* и *Ppo4*. При помощи сравнительного анализа экспрессии показано, что все четыре гена, кодирующие полифенолоксидазу, являются транскрипционно активными в зерновке ячменя на поздних стадиях созревания колоса. Было продемонстрировано, что экспрессия гена *Ppo2* специфично активируется только в линии с меланином в зерновке, и показано участие данного гена в синтезе меланина. Таким образом, была впервые выдвинута гипотеза о специфической активации гена *Ppo2* геном *Vlp1*.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате настоящего исследования были получены новые знания о механизмах генетической регуляции меланогенеза у ячменя, в том числе, выделены и проанализированы гены, которые вовлечены в синтез меланина. Разработанные ПЦР-маркеры к гену *Vlp1* могут быть использованы для эффективного маркер-контролируемого отбора генотипов ячменя с меланином в зерне. Помимо этого, результаты генотипирования и фенотипирования коллекций ячменя ВИР и ИЦиГ СО РАН пополнят информационные базы данных генетических коллекций новыми характеристиками, что важно для увеличения генетического разнообразия и дальнейшего использования.

Положения, выносимые на защиту

1. Ген, кодирующий сигнальный CLE-пептид из семейства CLAVATA, является кандидатом на роль *Vlp1*, контролирующего синтез меланина в зерновке ячменя.

2. В присутствии доминантного аллеля гена *Vlp1* происходит вторичная активация экспрессии ключевых генов биосинтеза фенилпропаноидов (*Pal*, *C4h*, *4Cl*) в перикарпе и цветковых чешуях ячменя.

3. Ген *Ppo2* вовлечен в синтез меланина в зерновке ячменя и его активность регулируется геном *Blp1*.

Вклад автора

Все основные результаты, описанные в данной работе, получены автором самостоятельно: выполнено ассоциативное картирование гена в локусе *Blp1*, включая разработку ПЦР-маркеров и подбор растительного материала, анализ структуры и функции гена-кандидата; проведен сравнительный анализ экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов в почти-изогенных линиях, а также анализ семейства генов полифенолоксидаз ячменя.

Апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК, входящих в Международные базы цитирования (WoS, Scopus). Результаты работы были представлены на научных конференциях: XI Международный Симпозиум «Фенольные Соединения: Фундаментальные и Прикладные Аспекты» (Москва, 2022); 5th International Webinar on Plant Science & Molecular Biology (Virtual Conference, 2022); Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (Plantgen2021): The 6th International Scientific Conference. (Novosibirsk, 2021); Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference. (Novosibirsk, 2020); Биология – наука XXI века: 24-я Международная Пушинская школа конференция молодых ученых (Московская обл., Пушкино, 2020); 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding. (Budapest, 2019); Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology (PlantGen2019): the fifth international scientific conference. (Novosibirsk, 2019); VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

По теме диссертации было опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

Публикации по теме работы в рецензируемых журналах:

1. **Glagoleva A.Y.**, Vikhorev A.V., Shmakov N.A., Morozov S.V., Chernyak E.I., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. Features of activity of the phenylpropanoid biosynthesis pathway in melanin-accumulating barley grains // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13. – I. 923717. DOI: 10.3389/fpls.2022.923717
2. **Glagoleva A.Y.**, Kukoeva T.V., Mursalimov S.R., Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. Effects of combining the genes controlling anthocyanin and melanin synthesis in the barley grain on pigment accumulation and plant development // *Agronomy*. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 112. DOI:10.3390/agronomy12010112
3. **Glagoleva A.Y.**, Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Melanin pigments in plants: current knowledge and future perspectives // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Т. 11. №. 770. DOI: 10.3389/fpls.2020.00770

Тезисы конференций по теме работы:

1. **Глаголева А.Ю.**, Вихорев А.В., Шмаков Н.А., Морозов С.В., Черняк Е.И., Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю. Особенности взаимодействия пигментов фенольной природы в колосе ячменя // XI Международный Симпозиум «Фенольные Соединения: Фундаментальные И Прикладные Аспекты» (Москва, 11-15 апреля 2022 г.). Сборник тезисов. – 2022. – С. 86.
2. **Glagoleva A.**, Mursalimov S., Gracheva N., Shmakov N., Kukoeva T., Khlestkina E., Shoeva O. Behind Black: Unfolding the Hidden Secrets of Plant Melanins // 5th International Webinar on Plant Science & Molecular Biology (Virtual Conference, 11-12 April, 2022). Abstracts. – 2022. – С. 11.

3. **Glagoleva A.Y.**, Shoeva O.Y., Kovaleva O.N., Khlestkina E.K. Association mapping of the gene controlling melanin synthesis in barley grain using plant genetic resources collections // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021): The 6th International Scientific Conference (Novosibirsk, June 14-18, 2021). Abstracts. – 2021. – С. 82. DOI 10.18699/PlantGen2021-066
4. **Glagoleva A.Y.**, Shmakov N.A., Vikhorev A.V., Mursalimov S.R., Gracheva N.V., Kukoeva T.V., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Exploring interaction between metabolic pathways involved in pigmentation of barley spike // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference (Novosibirsk, 06–10 July 2020). Abstracts. – 2020. – С. 312. DOI 10.18699/BGRS/SB-2020-196
5. **Глаголева А.Ю.**, Шмаков Н.А., Мурсалимов С.Р., Грачева Н.В., Кукоева Т.В., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Исследование взаимосвязи синтеза меланина и других пигментов в колосе ячменя // Биология – наука XXI века: 24-я Международная Пушчинская школа конференция молодых ученых (Пушино, 5-7 октября 2020 г.). Сборник тезисов. – 2020. – С. 120.
6. **Glagoleva A.Y.**, Mursalimov S.R., Gracheva N.V., Shmakov N.A., Levanova N.M., Börner A., Afonnikov D.A., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Current achievements in study of black-spiked barley // 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding (Hungary, Budapest, November 4-7, 2019). Abstracts. – 2019. – С. 22-23.
7. **Glagoleva A.Y.**, Shmakov N.A., Mursalimov S.R., Khlestkina E.K., Shoeva O.Yu. Study of genetic basis of the melanin biosynthesis in barley grain // Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology (PlantGen2019): the fifth international scientific conference (Novosibirsk, June 24–29, 2019). Abstracts. – 2019 – С. 80. DOI 10.18699/PlantGen2019-062.
8. **Глаголева А.Ю.**, Шмаков Н.А., Мурсалимов С.Р., Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю. Выявление генов-кандидатов локуса *Vlp*, контролирующего формирование признака чёрной окраски колоса ячменя (*Hordeum vulgare*

L.) // VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г.). Сборник тезисов. – 2019. – С. 844.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, перечня условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 147 страницах, содержит 16 рисунков и 8 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Типы пигментов растений и генетическая регуляция их биосинтеза

Помимо хлорофилла, придающего растениям зеленую окраску, растения вырабатывают целый ряд других пигментов, формирующих спектр от желтой до ярко-красной и черной окраски плодов и семян. Такая разнообразная окраска органов растений достигается преимущественно с помощью синтеза двух типов пигментов: каротиноидов, относящихся к группе изопреноидов и обуславливающих желтую, оранжевую и красную пигментацию органов растений, и пигментов фенольной природы, к которым относятся флавоноиды и меланины. Флавоноидные соединения, такие как ауроны, флавоны, флавонолы, гликозиды флавонолов и антоцианидины, наряду с каротиноидами, могут придавать желтый или оранжевый оттенок различным частям растения. Пигменты антоцианы обеспечивают розовую, красную, голубую и фиолетовую окраску. Красно-коричневая или темно-коричневая окраска семян растений также может быть обусловлена полимерными производными флавоноидов – проантоцианидинами (или конденсированными танинами) и флорафенами. И, наконец, черная окраска семян обусловлена наименее изученными на сегодняшний день пигментами растений – меланинами (Britton, 1983; Jana and Mukherjee, 2014).

Перечисленные пигментированные соединения, а также их неокрашенные предшественники являются вторичными метаболитами и выполняют важные функции в жизни растений, оказывая влияние на рост и развитие, выполняя защитные функции при различных типах биотического и абиотического стресса, участвуют в поддержании состояния покоя семян (Debeaujon et al., 2000; Ferdinando et al., 2012; Landi et al., 2015). Помимо важных функций, выполняемых полифенольными соединениями в жизни растений, в последнее время появляются данные о пользе группы

флавоноидных соединений для здоровья человека, связанные с их высокой антиоксидантной активностью. В частности, с потреблением антоцианов связывают уменьшение риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний (Tena et al., 2020; Юдина и др., 2021).

1.1.1 Биосинтез фенилпропаноидов

Фенилпропаноиды представляют собой большой класс вторичных метаболитов растений, синтез которых начинается с первичных метаболитов – фенилаланина или тирозина. Базовая структура фенилпропаноидов представлена бензольным кольцом с боковой С3-цепью. В зависимости от положения пропенильной двойной связи и заместителей в бензольном кольце, фенилпропаноиды можно разделить на пять основных групп: флавоноиды, монолигнолы, фенольные кислоты, стильбены и кумарины. Среди них флавоноиды, монолигнолы и фенольные кислоты являются универсальными группами соединений, которые представлены у всех растений (Deng and Lu, 2017).

Для большинства видов растений предшественником всех фенилпропаноидных соединений является фенилаланин, который в результате активности трех ключевых ферментов фенилпропаноидного пути – фенилаланинаммиаклиазы (PAL), циннамат-4-гидроксилазы (C4H) и 4-кумарат:КоА лигазы (4CL) – преобразуется в КоА-эфир кумаровой кислоты. Далее происходит разделение на две основные ветви фенилпропаноидного пути – путь биосинтеза флавоноидов и монолигнолов (Рисунок 1) (Deng and Lu, 2017). Однако, у некоторых однодольных растений биосинтез фенилпропаноидов может начинаться с тирозина, который деаминируется ферментом тирозинаммиаклиазой (TAL) или бифункциональной

аммиаклиазой (PTAL), превращая его сразу в п-кумаровую кислоту, минуя образование коричной кислоты (Deng and Lu, 2017).

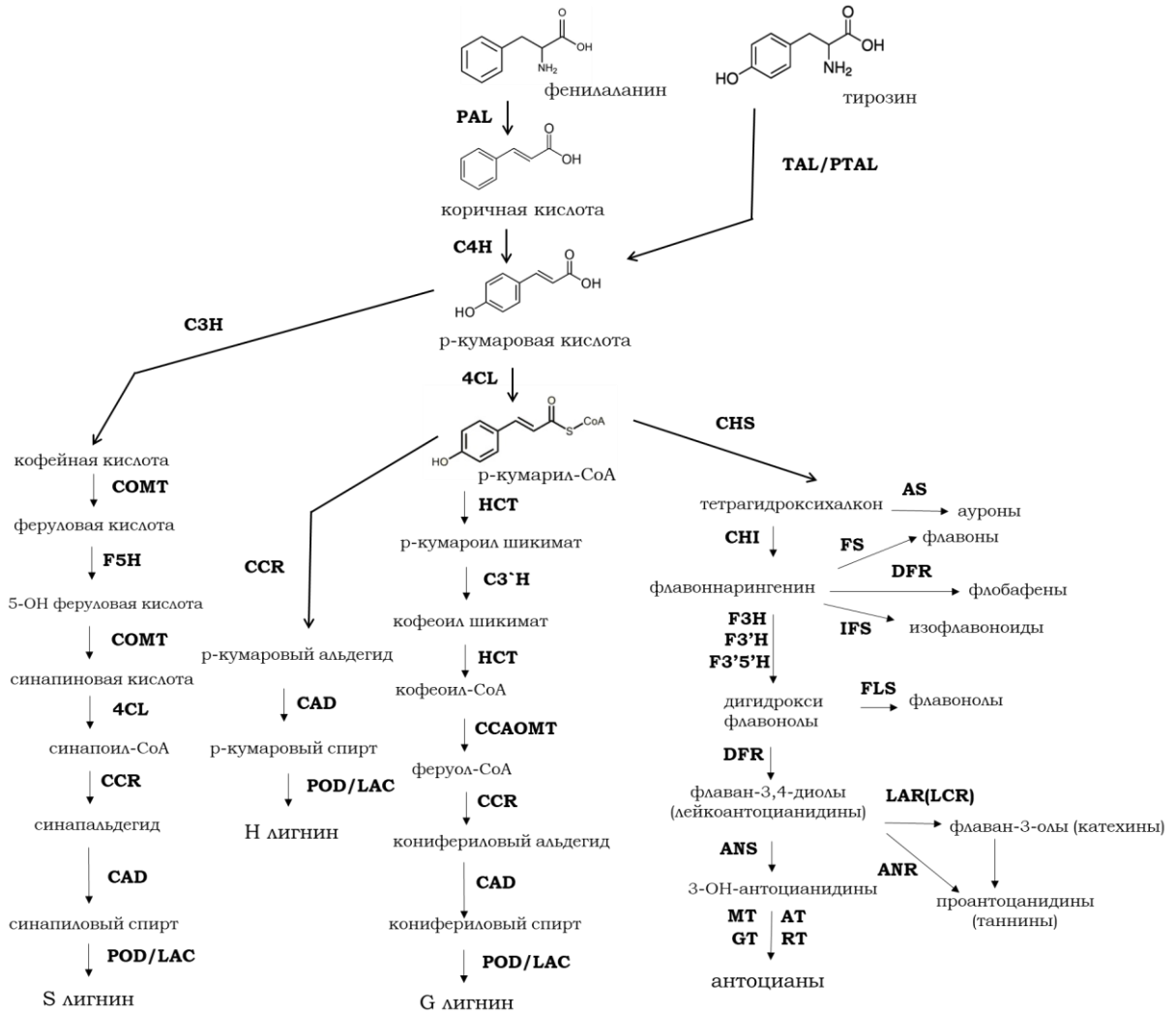


Рисунок 1. Схема биосинтеза фенилпропаноидов по Deng et al, 2017. Обозначения: фенилаланинаммиаклиаза (PAL) тирозинаммиаклиаза (TAL/PTAL), циннамат-4-гидроксилаза (C4H), 4-кумарат:КоА лигаза (4CL), гидроксицинамоил:КоА трансфераза (HCT), p-кумароилшикимат-3-гидроксилаза (C3H), кофеоилшикиматэстераза (CSE), кофеил:КоА о-метилтрансфераза (CCoAOMT), ферулат-5-гидроксилаза (F5H), о-метилтрансфераза кофеиной кислоты (COMT), циннамоил:КоА редуктаза (CCR), циннамилалкогольдегидрогеназа (CAD), пероксидаза (POD), лакказы (LAC), антоцианидинредуктаза (ANR); антоцианидинсинтаза (лейкоантоцианидиндиоксигеназа) (ANS (LDOX)), ауреузидинсинтаза (AS), ацетилтрансфераза (AT), халконфлавоноизомераза (CHI), халконсинтаза (CHS), дигидрофлавонол-4-редуктаза (DFR), флаванон-3-гидроксилаза (F3H), флавоноид-3'-гидроксилаза (F3'H), флавоноид-3',5'-гидроксилаза (F3'5'H), флавонолсинтаза (FLS), флавоносинтаза (FS), гликозилтрансфераза (GT), изофлавоносинтаза (IFS), лейкоантоцианидинредуктаза (LAR (LCR)), метилтрансфераза (MT), рамнозилтрансфераза (RT).

Гены, кодирующие PAL, часто имеют большую копияность в геномах растений. У таких дублированных генов зачастую наблюдается субфункционализация – ткане/органоспецифичная экспрессия копий генов

или различная экспрессия в ответ на внешние раздражители. К примеру, у тополя была выявлена органспецифичная экспрессия для трех из пяти генов PAL (Kao et al., 2002). Для двух из трех генов была показана экспрессия в лигнифицируемых тканях, при этом один из них вовлечен непосредственно в биосинтез лигнина, другой же специализируется на синтезе конденсированных таннинов, а экспрессия третьего гена связана со стадией цветения, однако, его точная функциональная роль остается неизвестной (Hamberger et al., 2007). Вместе с тем, гены, кодирующие C4H и 4CL, обычно представлены небольшими генными семействами, либо вообще единичными копиями в геномах растений (Hamberger et al., 2007).

Монолигнолы, включающие п-кумаровый, кониферилловый и синапиловый спирты, являются субъединицами лигнина, который является основным компонентом клеточной стенки растений. Биосинтез монолигнолов через п-кумароил-CoA включает образование п-кумарового альдегида, катализируемое циннамоил-CoA-редуктазой (CCR), с последующим превращением в п-кумаровый спирт под действием циннамилалкоголдегидрогеназы (CAD). Кониферилловый и синапиловый спирты также могут синтезироваться путем превращения п-кумароил-CoA в кофейную кислоту посредством HCT (гидроксициннамоил-CoA: шикимат гидроксициннамоилтрансферазы), C3'H (4-кумароилшикимат/хинат 3'-гидроксилазы), CSE (кофеоилшикиматэстеразы) или C3H (п-кумароилшикимат-3-гидроксилазы). Далее кофейная кислота может быть преобразована в феруловую и синапиновую кислоты или ее производные с помощью о-метилтрансфераз (COMT и CCoAOMT) и ферулат-5-гидроксилазы (F5H). Наконец, монолигнолы полимеризуются лакказами или пероксидазами с образованием п-гидроксифенильных (H), гваяцильных (G) и сирингильных (S) мономерных единиц лигнина (Barros et al., 2019; Marchiosi et al., 2020; Vogt, 2010; Yang et al., 2017).

Стильбены и кумарины менее распространены среди растений и менее изучены, чем флавоноиды и монолигнолы. Стильбены синтезируются из производных коричной кислоты (преимущественно п-кумарил-СоА и циннамоил-СоА) и малонил-СоА под действием стильбенсинтазы (STS) с образованием ресвератрола. После чего под действием специфических ферментов стильбены могут быть гликозилированы, метилированы или пренилированы с образованием различных стильбеновых производных (Chong et al., 2009; Dubrovina and Kiselev, 2017). Как и стильбены, кумарины также синтезируются из производных коричной кислоты, таких как п-кумаровая и феруловая кислоты, путем орто-гидроксилирования ароматического кольца 2-оксоглутарат-зависимыми диоксигеназами (2OGD) (Shimizu, 2014). Стильбены и кумарины, как и многие фенольные соединения растений, являются фитоалексинами, участвуя в защите растений при воздействии патогенов (Chong et al., 2009; Sun et al., 2014).

1.1.2 Регуляция пути биосинтеза фенилпропаноидов

Биосинтез и накопление отдельных соединений группы фенилпропаноидов определяется специфической активацией экспрессии генов данного метаболического пути, которая может иметь как пространственный характер (специфическая активация экспрессии в определенных органах и клетках растения), так и временной (активация на определенных стадиях развития растения). Характер экспрессии генов может изменяться как в ответ на эндогенные стимулы, например, изменение концентрации отдельных метаболитов или гормонов, так и в ответ на экзогенные стимулы – УФ-излучение, засуха, холод, воздействие патогенов (Weisshaar and Jenkins, 1998). Изменение экспрессии структурных генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов, в ответ на вышеперечисленные стимулы происходит за счет действия регуляторных

генов – транскрипционных факторов (ТФ), способных специфически связываться с регуляторными последовательностями структурных генов (Grotewold, 2006).

Система регуляции биосинтеза флавоноидов является одной из наиболее подробно изученной у растений. В регуляции биосинтеза флавоноидов у растений принимают участие три основные группы регуляторных факторов: MYB, MYC (bHLH) и WD40, образующие комплекс MBW, необходимый для активации структурных генов.

Факторы транскрипции типа MYB характеризуются N-концевым доменом, который состоит из одного-трех повторов (R1, R2 и R3), включающих 50-53 аминокислотных остатка. N-концевой домен MYB участвует в связывании и димеризации ДНК, тогда как C-концевая область регулирует экспрессию гена-мишени (Dubos et al., 2010). Основываясь на количестве повторов R1, R2 и R3, белки MYB можно разделить на четыре основных подсемейства, включая 1R-MYB (R1/2/3-MYB и белки, родственные MYB), 2RMYB (R2R3-MYB), 3R-MYB (R1R2R3-MYB) и 4R-MYB (R1R2R2R1/2-MYB). Среди них R2R3-MYB являются крупнейшим подсемейством MYB у растений (Dubos et al., 2010). Первыми среди растений были открыты MYB-подобные факторы транскрипции R2R3 типа у кукурузы, регулирующие биосинтез флавоноидных пигментов антоцианов (Paz-Ares et al., 1987). В MBW-комплексе белки R2R3-MYB ответственны за светозависимую регуляцию биосинтеза (Taylor and Briggs, 1990). У кукурузы факторы R2R3-MYB кодируются генами *C1* (*Colorless 1*), *P1* (*Purple 1*) и *Pl1* (*Purple leaf 1*) (Goff et al., 1990; Paz-Ares et al., 1987; Petroni and Tonelli, 2011).

MYC-подобные факторы, несущие консервативный домен bHLH (basic helix-loop-helix, основной спираль-петля-спираль домен), также участвуют в связывании и димеризации ДНК, и ответственны в MBW-комплексе за тканеспецифичность биосинтеза антоцианов (Grotewold, 2006; Taylor and Briggs, 1990). Первые гены, кодирующие MYC-подобные факторы B/R типа

(по названию соответствующих локусов – В и R), были открыты также у кукурузы (Chandler et al., 1989). Белки WD40 характеризуются пептидным мотивом из 44–60 аминокислот, часто заканчивающийся дипептидом триптофан-аспарагиновая кислота (W-D), который тандемно повторяется в белке 4–16 раз (Nichri et al., 2011). Фактор WD40 необходим для стабилизации комплекса MBW; первый представитель данной группы у растений, *An11*, был описан у петунии (de Vetten et al., 1997). Транскрипционные факторы MYB могут регулировать экспрессию генов как самостоятельно, так и в составе регуляторных комплексов MBW и MYB-bHLH (Deng and Lu, 2017). К примеру, у кукурузы структурные гены биосинтеза антоцианов совместно (как одна функциональная единица) регулируются с помощью комплекса MBW (Рисунок 2), в то время как у арабидопсиса среди генов биосинтеза антоцианов выделяют «ранние» и «поздние» гены. «Ранние» экспрессируются в отсутствие синтеза пигментов, благодаря активации с помощью определенного MYB-фактора, а «поздние» – активируются при участии комплекса MBW. Предположения о том, что эти особенности отражают характерные отличия однодольных от двудольных, не оправдались, когда выяснилось, что и среди более мелких таксонов встречаются свои специфические особенности. Таким образом, у разных видов растений совместно происходит регуляция разных групп генов, и нет четкого разделения на «ранние» или «поздние» гены. Также иногда могут особо регулироваться отдельные гены в пути биосинтеза антоцианов, например, ген *F3h* у пшеницы (Аджиева et al., 2015).

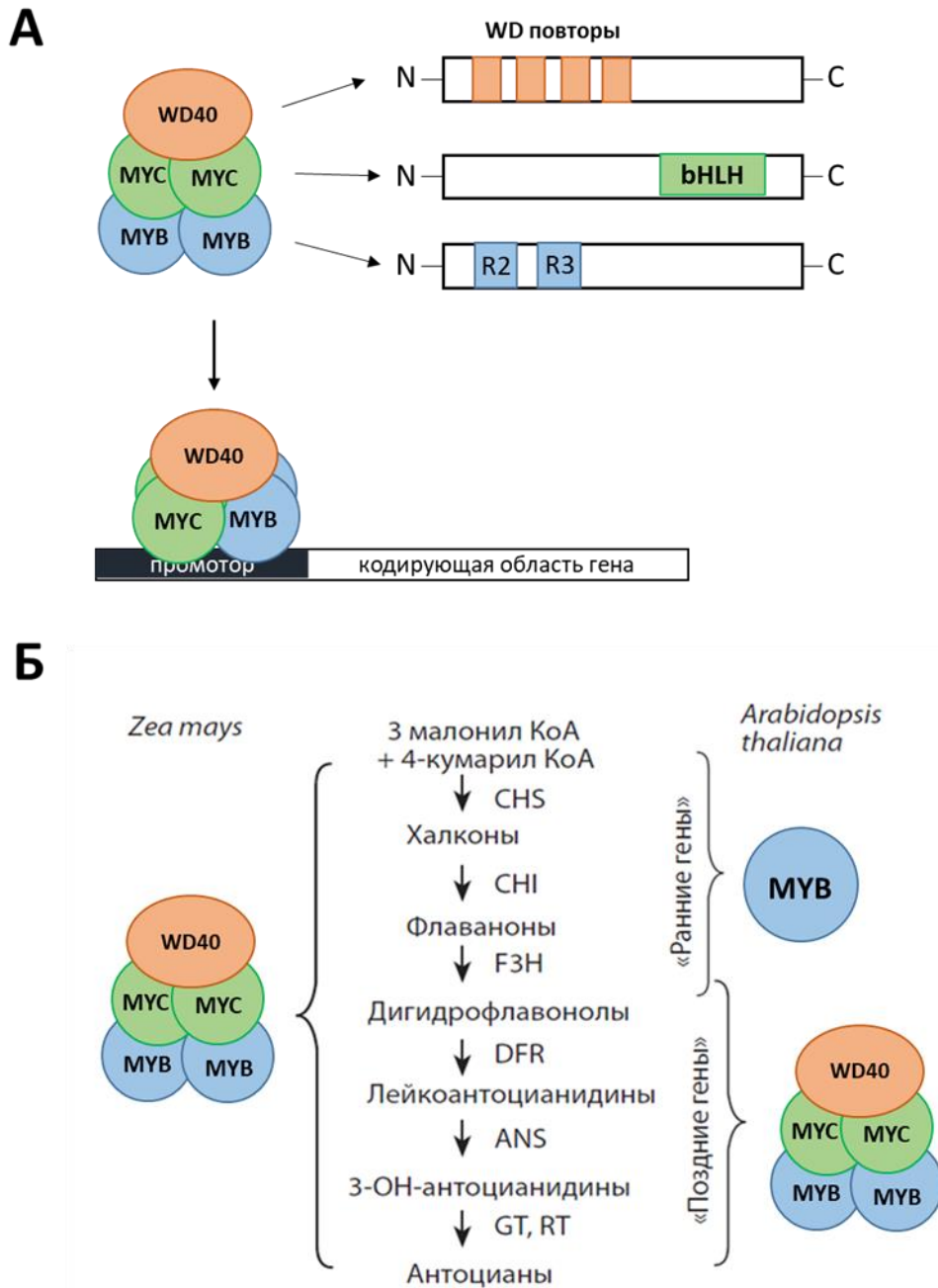


Рисунок 2. (А) Структура белков MYB, MYC, WD40, формирующих комплекс MBW. (Б) Биосинтез антоцианов и проантоцианидинов и его регуляция у представителей однодольных (*Zea mays*) и двудольных (*Arabidopsis thaliana*) растений по Аджиева, 2015. Ферменты: ANS – антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; GT – гликозилтрансфераза; RT – рамнозилтрансфераза. Транскрипционные факторы: MYB, MYC, WD40.

Транскрипционные факторы MYB совместно с другим классом транскрипционных факторов – NAC, участвуют в регуляции синтеза монолигнолов. Белки NAC составляют большое семейство специфичных для

растений ТФ, которые характеризуются наличием высококонсервативной N-концевой области, известной как домен NAC, который участвует в специфическом связывании с ДНК (Olsen et al., 2005). С-концевая область характеризуется большей вариабельностью и функционирует как домен, регулирующий транскрипцию (Jensen et al., 2010; Olsen et al., 2005). Совместно с МУВ, белки NAC участвуют в образовании вторичной клеточной стенки растений. Гены NAC, такие как VND (vascular-related NAC-domain), NST (NAC secondary wall-promoting factor) и SND (secondary wall-associated NAC domain protein) являются вышестоящими ТФ в регуляторной сети и управляют активностью нижестоящих ТФ, включая МУВ, в биосинтезе целлюлозы, ксилана и лигнина в различных тканях (Nakano et al., 2015).

1.1.3 Пигменты флавоноидной природы в зерновке ячменя

Высокая степень изменчивости по окраске зерна ячменя обусловлена разнообразием генетических механизмов, определяющих как тип накапливаемого пигмента, так и место его синтеза. Фиолетовая окраска ячменя обусловлена накоплением пигментов антоцианов в перикарпе и цветковых чешуях, в то время как антоцианы, накапливающиеся в алейроновом слое, придают зерну серо-голубой цвет (Harlan, 1914). Привычная желтая и коричневатая окраска ячменя обусловлена синтезом и накоплением полимерных соединений проантоцианидинов в оболочке зерна (testa) (Aastrup et al., 1984) (Рисунок 3).

В настоящий момент в геноме ячменя идентифицированы и локализованы основные структурные гены, кодирующие ферменты метаболизма флавоноидов: халконсинтазу (CHS), халконфлаванонизомеразу (CHI), флаванон-3-гидроксилазу (F3H), флавоноид-3'-гидроксилазу (F3'H), флавоноид-3', 5'-гидроксилазу (F3'5'H), дигидрофлавонол-4-редуктазу

(DFR), антоцианидинсинтазу (ANS), UDP-флавоноид-3-О-гликозилтрансферазу (UFGT) (Jende-Strid, 2004; Shoeva et al., 2018).

Различия, связанные с типом и локализацией пигмента, обусловлены специфической регуляцией экспрессии структурных генов факторами транскрипции. Наличие фиолетовых пигментов в перикарпе и чешуях ячменя определяется комплементарным действием генов *Ant1* и *Ant2*, которые локализованы на хромосомах 7Н и 2Н, соответственно. Ген *Ant1* кодирует MYB-подобный транскрипционный фактор и обладает плейотропным действием, контролируя антоциановую окраску основания растения (Gordeeva et al., 2019; Himi and Taketa, 2015; Shoeva et al., 2015). Ген *Ant2* кодирует транскрипционный фактор MYC (Cockram et al., 2010; Lahaye et al., 1998). Было показано, что при наличии доминантных генов *Ant1* и *Ant2* происходит специфическая активация экспрессии генов *F3'h* и *Ans* в перикарпе ячменя (Gordeeva et al., 2019).

Голубая окраска алейронового слоя обусловлена наличием пяти комплементарных доминантных генов *Blx* (*Non-blue aleurone xenia*): *Blx1-Blx5*. Гены *Blx1*, *Blx3* и *Blx4* тесно сцеплены и картированы на хромосоме 4HL. Гены *Blx2* и *Blx5* картированы на хромосоме 7HL (Finch and Simpson, 1978). На данный момент, выделены и аннотированы гены, кодирующие транскрипционные факторы MYC, MYB и WD40, регулирующие биосинтез антоцианов в алейроне (Strygina et al., 2017). Эти гены были обозначены: *HvMyc2* (4HL), *HvMrc2* (4HL) и *HvWD40-1* (6HL). Была показана тканеспецифичная экспрессия гена *HvMyc2* в алейроновом слое, вне зависимости от окраски ткани. В отличие от тканеспецифического *HvMyc2*, экспрессия гена *HvMrc2* наблюдалась в разных тканях, однако его активность не обнаруживалась в неокрашенном алейроне по сравнению с окрашенным. Ген *HvMyc2*, а также структурный ген *HvF3'5'h* были точно картированы в позиции кластера *Blx* в длинном плече хромосомы 4Н (Matthews et al., 2003;

Strygina et al., 2017), тем самым они стали кандидатами для двух из трех тесно сцепленных генов *Blx*.

Специфичным регулятором биосинтеза проантоцианидинов, обуславливающих желтую и красно-коричневую окраску зерна, предположительно является ген *Ant28*. У растений с мутацией в гене *Ant28* не происходит синтез проантоцианидинов в зерне, в то время как уровень содержания антоцианов в вегетативных органах остается таким же, как и у дикого типа. Также было показано, что у растений, мутантных по *Ant28*, снижена активность ферментов DFR и LAR, которые необходимы для синтеза проантоцианидинов (Jende-Strid, 2004). Данный локус картирован на длинном плече хромосомы 3Н и кодирует MYB-подобный транскрипционный фактор (Himi et al., 2012).

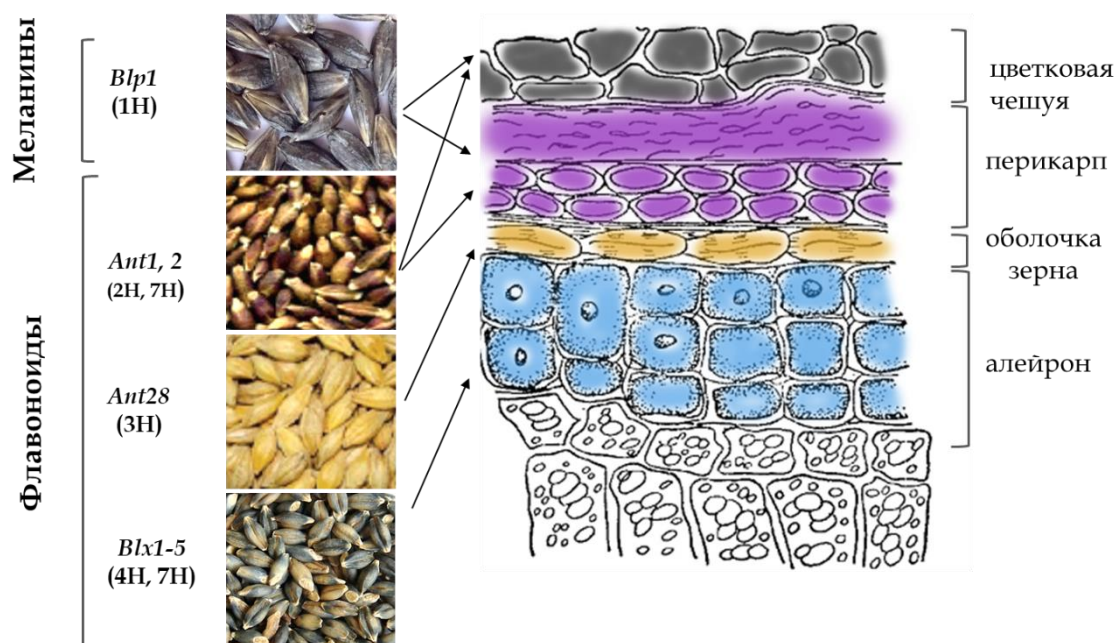


Рисунок 3. Локализация пигментов в различных слоях зерновки ячменя.

1.2. Меланины растений

Коричневая и черная окраска оболочек семян является широко распространенным признаком у растений. Такой тип окраски может быть обусловлен меланинами, которые представляет собой высокомолекулярные соединения, образующийся в результате окисления и полимеризации фенолов (Britton, 1983; Solano, 2014). Меланины присутствуют во всех царствах живых организмов, но до сих пор остаются самыми малоизученными пигментами растений. Долгое время черные пигменты растений не считались меланином, поскольку, согласно определению термина «меланин», которое было сформулировано на основе исследований на животных, он должен быть азотсодержащим пигментом, в то время как меланин в растениях не содержит азота (Prota, 1992; Thomas, 1955). Сравнительные исследования черных пигментов, выделенных из микроорганизмов, растений и животных, выявили их общие физико-химические свойства, за исключением наличия азота (Nicolaus et al., 1964). Терминология была пересмотрена, и наличие азота было исключено из определения термина «меланин» (Britton, 1983; Solano, 2014). В настоящее время различают три типа меланина: эумеланины, феомеланины и алломеланины. Эумеланины – являются преобладающим типом меланинов, которые идентифицированы у животных и микроорганизмов, а также у некоторых грибов; феомеланины специфичны для млекопитающих и птиц. Оба они являются производными тирозина, но феомеланины состоят из серосодержащих мономерных единиц, в основном бензотиазина и бензотиазола, вместо индольных единиц в эумеланинах. Меланин растений и грибов, лишенный азота, обычно называют алломеланином (другой меланин). Это самая разнородная группа, поскольку в качестве мономеров могут выступать различные соединения. Меланин грибов может быть образован из гамма-глутамил-3,4-дигидроксибензола, катехола и 1,8-дигидроксинафталина, в то время как катехиновая, кофейная, хлорогеновая, протокатехиновая и галловая кислоты считаются возможными

предшественниками меланина у растений (Bell and Wheeler, 1986; Lyakh, 1981; Solano, 2014). Благодаря уникальным свойствам меланина, таким как стабильное состояние свободных радикалов, поглощение ультрафиолетового и видимого света, а также способность к комплексообразованию и ионному обмену, эти пигменты привлекают все больший интерес в качестве материалов для широкого спектра биомедицинских и технологических применений (Di Mauro et al., 2017; D'Ischia, 2018; Vahidzadeh et al., 2018).

1.2.1 Физико-химические методы выделения меланина

Стандартный протокол выделения меланинов включает их щелочную экстракцию с последующим осаждением в кислых условиях (Sava et al., 2001). Полученный таким образом пигментный материал представляет собой темный глянцевый порошок, нерастворимый в воде и большинстве органических растворителей, частично растворимый в концентрированной серной и азотной кислотах и полностью растворимый в гидроксиде натрия. При воздействии сильных окислителей, таких как перекись водорода, перманганат калия или бромная вода, пигмент теряет свой цвет, а воздействие хлорида железа приводит к выпадению хлопьевидного осадка, который постепенно растворяется снова при повышении концентрации хлорида железа. Результаты описанных реакций указывают на присутствие хиноидных и фенольных групп в меланинах (Downie et al., 2003; Fox and Kuchnow, 1965; Lyakh, 1981; Shoeva et al., 2020; Thomas, 1955).

Помимо химических тестов, для идентификации меланина применяются спектроскопические методы. Оптическая спектроскопия (Ultraviolet–visible spectroscopy, UV–VIS) наиболее широко используется для идентификации и количественного определения меланинов. Меланины различного происхождения характеризуются высоким поглощением в видимой и ультрафиолетовой областях спектра с максимумом в области 196–300 нм

(Lyakh, 1981; Pralea et al., 2019). Для идентификации основных функциональных групп в макромолекулах меланина используется инфракрасная Фурье-спектроскопия (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT–IR). Типичные ИК-Фурье спектры меланина включают характерные полосы для фенольных фрагментов, хинона, алифатических углеводородных групп, ароматической углеродной основы (Mboniyivuze et al., 2015; Pralea et al., 2019). Анализ ядерного магнитного резонанса (ЯМР) может использоваться для подтверждения присутствия в меланинах ароматических атомов водорода и углерода, метильных или метиленовых групп, связанных с атомами азота и/или кислорода, NH-группы, связанной с индолом, алкильных фрагментов (Pralea et al., 2019).

Благодаря использованию химических тестов в сочетании с некоторыми из описанных спектроскопических методов, наличие меланина в оболочках семян было продемонстрировано для следующих растений: арбуза (Nicolaus et al., 1964), подсолнечника (Gracheva and Zheltobryukhov, 2016; Nicolaus et al., 1964), гречихи (Zhuravel, 2010), винограда (Zherebin and Litvina, 1991), томата (Downie et al., 2003), османтуса (H. Wang et al., 2006), жасмина (Kannan and Ganjewala, 2009), кунжута (Panzella et al., 2012), ипомеи (Park, 2012), черной горчицы и рапса (C. Y. Yu, 2013), каштана (Yao et al., 2012), чеснока (L. F. Wang and Rhim, 2019), овса (Varga et al., 2016), арахиса (Wan et al., 2016) и ячменя (Shoeva et al., 2020).

1.2.2 Функции меланина растений

Считается, что черная пигментация возникла в результате адаптации живых организмов к неблагоприятным условиям окружающей среды. Функциональное значение этого типа пигментов подробно рассмотрено для животных, насекомых и микроорганизмов (Cordero and Casadevall, 2017; Solano, 2014). Точная роль меланина в растениях все еще остается

неопределенной, однако исходя из имеющихся литературных данных можно предположить, что черная окраска семян может давать им некоторые преимущества.

Как и у животных, темная окраска растений важна для маскировки. Например, зерна большинства диких злаков являются темноокрашенными. Таким образом, зрелые семена, падающие на землю, покрытые черной оболочкой, становятся невидимыми для птиц на фоне темной почвы (Zhu et al., 2011).

Из-за способности черных поверхностей поглощать больше солнечной энергии, чем светлые, и преобразовывать ее в тепло, предположительно, черные семена могут созревать раньше, чем неокрашенные. Сравнительное исследование староместных сортов ячменя с черными и белыми семенами показало, что сорта с черной окраской зерна имеют свойство созревать раньше, чем неокрашенные (Ceccarelli et al., 1987).

Меланины придают оболочке семян дополнительную механическую прочность, защищая их от повреждений. Более того, меланин обеспечивает устойчивость к насекомым и вредителям из-за своей токсичности (Jana and Mukherjee, 2014). У подсолнечника семена с черной оболочкой меньше повреждаются личинками моли, чем белые семена (Pandey and Dhakal, 2001).

Поскольку меланины являются сильными антиоксидантами (Lopusiewicz, 2018; Panzella et al., 2012), они могут обеспечивать повышенную жизнеспособность семян, защищая их от неблагоприятных факторов среды. К примеру, у арбуза коричневые семена являются более жизнеспособными, чем светлые семена; они обладают большей массой и характеризуются более высоким процентом прорастания и всхожести, чем у светлых семян (Mavi, 2010). Местные сирийские староместные сорта ячменя с черными семенами выращивают в наиболее засушливых регионах страны, в отличие от староместных сортов с белыми зернами, которые адаптированы к более мягким условиям выращивания (Ceccarelli et al., 1987). Сравнение этих

образцов показало, что образцы с черными зерновками более устойчивы к холоду и засухе, чем образцы с белыми зерновками (Ceccarelli et al., 1987; Weltzien, 1988). Исследования защитных функций меланина в зерновке ячменя в условиях засоления, засухи и загрязнения ионами кадмия с использованием почти-изогенных линий, контрастных по наличию меланина, показали, что меланин не дает проросткам ячменя каких-либо преимуществ в условиях абиотического стресса (Glagoleva et al., 2019). Другие данные о защитных функциях меланинов были получены при тестировании устойчивости к патогенам. Сорта ячменя и овса с темной окраской колоса меньше поражались фузариозом, чем сорта с неокрашенным зерном (Loskutov et al., 2016; Zhou et al., 1991). Также на рекомбинантных инбредных линиях ячменя (RIL) с черными и белыми зерновками была продемонстрирована сниженная заболеваемость фузариозом и меньшее накопление микотоксина у черноокрашенных RIL по сравнению с неокрашенными (Choo et al., 2015).

Известно, что соединения, накапливающиеся в оболочке семян, влияют на период покоя и скорость прорастания (Debeaujon et al., 2000; Gu et al., 2011). Это верно в случае флавоноидных пигментов, но в случае меланина были получены противоречивые результаты. Например, у мутантных растений томата с черной окраской оболочки семян, обусловленной накоплением меланина, была показана сниженная скорость прорастания семян, а также сниженное содержание воды и гиббереллина по сравнению с семенами дикого типа (Downie et al., 2003). Однако, сравнительный анализ всхожести и прорастания семян почти-изогенных линий ячменя не выявил значимых отличий между белозерными и чернозерными формами (А. У. Glagoleva et al., 2019).

1.2.3 Меланины в колосе ячменя

1.2.3.1. Признак черной окраски колоса ячменя

Пигментация зерновки является важным таксономическим признаком и используется исследователями в классификации разновидностей ячменя. Черная и коричневая окраска перикарпа и цветковых чешуй является распространенной, и согласно классификации ячменя, используемой в России, такой тип пигментации описан для 43 разновидностей ячменя (Кобылянский and Лукьянова, 1990).

Еще в начале XX века при помощи химических тестов было показано, что пигменты, обуславливающие окраску зерновки ячменя, можно разделить на две группы: антоцианы, растворимые в слабых кислотных и щелочных растворах, и приобретающие розовый цвет в кислой среде и голубой цвет в щелочной среде, и меланин-подобные пигменты, нерастворимые и не меняющие свой цвет в кислоте и щелочи (Harlan, 1914).

Благодаря яркому фенотипическому проявлению, характер наследования признака черной окраски зерновки активно изучался исследователями. При анализе скрещиваний черnozерных и белозерных форм ячменя в поколении F_2 наблюдалось два фенотипических класса, соответствующих окраске родительских форм с доминантным проявлением черной окраски. Более того, было показано, что черная окраска перикарпа и цветковых чешуй всегда наследуется совместно и контролируется одним локусом (Buckley, 1930; Woodward, 1941). Локус, контролирующий данный признак, получил название *Bb* (*Black*), и был нанесен на генетическую карту ячменя в группе сцепления 2 (Roberson and Deming, 1930). Впоследствии локус был переименован в *Blp1* (*black lemma and pericarp 1*) и локализован на длинном плече хромосомы 1Н, согласно номенклатуре хромосом ячменя, принятой в 1996 году (Lundqvist et al., 1997).

В зависимости от интенсивности проявления черной окраски, было выделено несколько фенотипических групп: насыщенный черный (dense black) – ячмень с интенсивной черной окраской перикарпа, цветковых чешуй и остей; черный (black) – с черной окраской чешуй и перикарпа, но неокрашенными остями; умеренно черный (medium black) – ячмень с более светлой окраской чешуй и перикарпа; серый (gray) – ячмень с серой и серовато-желтой окраской зерновки. Было показано, что описанные выше фенотипы являются стабильными и интенсивность их пигментации сохранялась вне зависимости от условий среды (Woodward, 1941). При анализе расщеплений, полученных в результате скрещиваний образцов ячменя с пигментированной зерновкой с белозерным ячменем, было продемонстрировано, что меланиновая пигментация всегда имеет моногенное доминантное наследование. При скрещивании форм ячменя с различной интенсивностью пигментации всегда наблюдалось два фенотипических класса, соответствующих фенотипам родителей, в соотношении 3:1, где более темная окраска доминировала над более светлой. Поскольку потомки, полученные в результате скрещиваний форм ячменя с интенсивной черной и черной окраской были практически неотличимы между собой, было предположено наличие только трех доминантных аллелей локуса *Blp1*: *Blp1.b* (B), *Blp1.mb* (B^{mb}) и *Blp1.g* (B^g), определяющих черный, темный и серый цвет зерновки ячменя, соответственно (Woodward, 1941, 1942; Lundqvist et al., 1997).

1.2.3.2. Картирование локуса *Blp1*

Поскольку черная окраска зерновки является признаком, который легко определить визуально, локус *Blp1* нанесен на многие разработанные молекулярно-генетические карты как морфологический маркер. Например, локус *Blp1* был картирован в позиции 129,5 сМ между AFLP маркерами

E38M61-75 (126,3 cM) и E32M49-81 (132 cM) в картирующей популяции дигаплоидов Oregon Wolfe Barleys (Costa et al., 2001).

Локус *Blp1* был картирован в позиции 201,6 cM между EST маркерами, ограничивающими район 188,2–201,6 cM хромосомы 1Н на молекулярно-генетической карте на основе популяции RILs (рекомбинантных инбредных линий), полученных в результате скрещивания непигментированного сорта Naruna Nijo с диким ячменем *H. spontaneum* H602, обладающим черной окраской зерновки (Hori et al., 2005).

В картирующей популяции F₂, полученной на основании скрещивания белозерного ячменя сорта Cheri с диким ячменем ICB181160 с черной пигментацией зерновки, локус *Blp1* был локализован в районе протяженностью 10 cM между CAPS маркерами CAPS026 и CAPS030. При сопоставлении полученной молекулярно-генетической карты с физической было установлено, что в идентифицированном районе предсказано 104 гена (Bungartz et al., 2016).

В 2017 году Jia с соавторами удалось значительно сузить район локализации *Blp1* при помощи подхода массового сегрегационного анализа (BSA, Bulk segregant analysis) совместно с методом секвенирования локус-специфичных ампликонов (SLAF-seq, Specific-locus amplified fragment sequencing) (Jia et al., 2017). Сначала была получена картирующая популяция F₂ на основании скрещивания сорта ячменя Hatiexi No.1 с черной зерновкой и неокрашенного сорта Zhe5819, которая включала 551 растение с черной и 172 растений с белой зерновкой. Затем, полученные растения были объединены в два пула – с черной и с белой зерновкой, которые были секвенированы при помощи SLAF-seq. В результате анализа ассоциации выявленных SNP с признаком черной окраски была определена локализация гена *Blp1* в районе протяженностью 5,68 Mb. Для еще большего сужения локуса, выделенная область была дополнительно насыщена SNP-маркерами, что, в конечном счете, позволило локализовать *Blp1* между маркерами HZSNP63 и HZSNP59,

фланкирующими район протяженностью 1,66 Мб, в котором было предсказано 42 гена (Jia et al., 2017).

В 2019 году при помощи SNP-генотипирования популяции удвоенных гаплоидов, полученной на основе скрещивания сортов Hindmarsh с белой окраской и дикого ячменя W1 с черной окраской, с последующим насыщением локуса InDel маркерами и используя дополнительно материал трех популяций рекомбинантных инбредных линий, locus *Blp1* был картирован в районе протяженностью 0,8 Мб на хромосоме 1Н, в котором предсказан 21 ген (Long et al., 2019).

Несмотря на предпринятые попытки точного картирования локуса *Blp1*, ген-кандидат, ответственный за формирования меланиновой пигментации перикарпа и цветковых чешуй, остается невыделенным, что, в первую очередь, связано с недостаточной изученностью механизмов генетической регуляции синтеза меланина у ячменя и растений в целом.

1.2.3.3. Влияние гена *Blp1* на синтез других пигментов в зерновке ячменя

1.2.3.3.1 Влияние гена *Blp1* на синтез антоцианов

Меланины и антоцианы являются пигментами фенольной природы и используют в качестве субстратов соединения, образующиеся в пути биосинтеза фенилпропаноидов, однако, они имеют различную химическую и генетическую природу. Пигменты ячменя были разделены на антоцианы и меланины еще в начале прошлого века (Harlan, 1914), и в последствии появлялось все больше данных, позволяющих разделить две эти группы соединений.

При помощи сравнительного анализа экспрессии ключевых структурных генов биосинтеза антоцианов (*Chs*, *Chi*, *F3h*, *F3`h*, *Dfr*, *Ans*), а также гена *Ant2* (bHLH), регулирующего фиолетовую окраску перикарпа

ячменя, было показано, что экспрессия данных генов не повышается в ответ на появление меланиновой пигментации и значимо не отличается от непигментированного сорта Bowman (Shoeva et al., 2016). Данное наблюдение было затем подтверждено при помощи сравнительного транскриптомного анализа; было установлено, что в почти-изогенной линии ячменя, накапливающей меланин, гены пути биосинтеза флавоноидов не повышают свою экспрессию, однако наблюдается повышенная экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов (Glagoleva et al., 2017).

В отличие от пигментов беталаинов, которые, как и меланины, являются производными тирозина и их биосинтез происходит при участии ферментов тирозиназ (Britton, 1983; Harris et al., 2012; Solano, 2014), меланины могут синтезироваться и накапливаться одновременно с антоцианами. Однако, две эти группы пигментов обуславливают разные паттерны пигментации, а также их появление происходит на разных стадиях созревания колоса. Появление антоциановой окраски перикарпа ячменя происходит на стадии молочно-восковой спелости зерновки, причем окраска перикарпа сразу становится равномерно розовой и по мере созревания приобретает более насыщенный цвет (Рисунок 4). Меланиновая пигментация появляется на более поздней стадии – восковой, и, в отличие от антоцианов, меланиновая окраска перикарпа развивается постепенно; сначала появляются отдельные пятна, которые увеличиваются и сливаются по мере созревания растения (Рисунок 4) (Glagoleva et al., 2022; Shoeva et al., 2020).

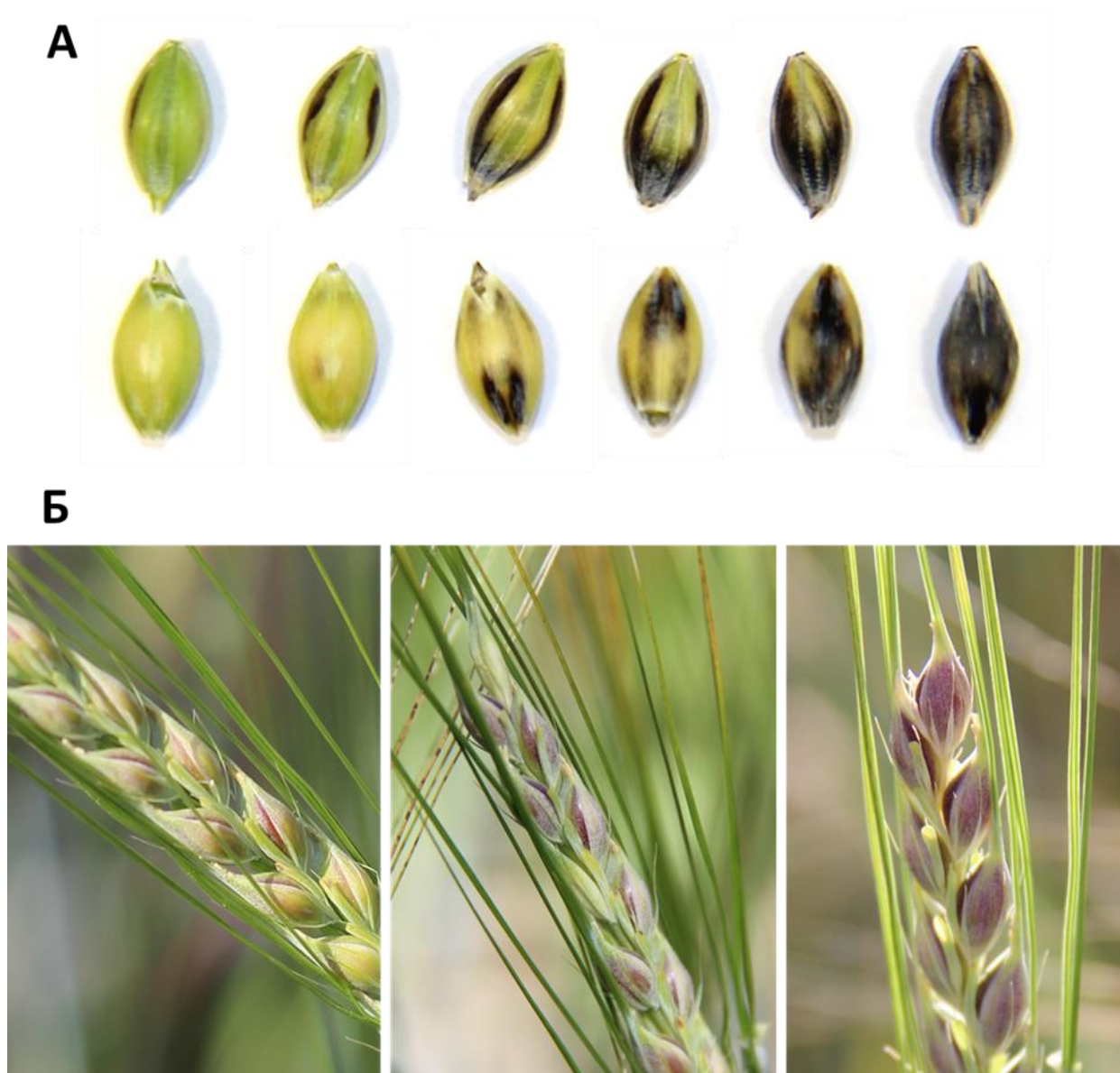


Рисунок 4. (А) Развитие меланиновой пигментации зерновки линии *i:WwBlp1* по мере ее созревания. (Б) Развитие антоциановой пигментации по мере созревания колоса в линии *i:WwAnt1Ant2*.

Изучение почти-изогенной линии ячменя, несущей доминантные аллели генов *Blp1*, *Ant1* и *Ant2* и характеризующейся совместным накоплением антоцианов и меланинов в перикарпе, показало, что ген *Blp1*, хоть и не вовлечен в синтез антоцианов сам по себе, оказывает влияние на интенсивность их накопления. При сравнении данной линии с родительскими линиями, которые характеризуются накоплением либо антоцианов, либо меланинов, было отмечено, что в присутствии доминантного аллеля гена *Blp1*

происходит активация генов пути биосинтеза антоцианов на более ранней стадии созревания колоса, чем в родительской линии. В результате количественной оценки содержания антоцианов в зерновке было продемонстрировано, что в данной линии происходит значимое увеличение количества антоцианов по сравнению с родительской линией на стадиях молочно-восковой и восковой спелости, однако в зрелом зерне количество антоцианов значимо не отличается между линиями (Glagoleva et al., 2022; Vikhorev et al., 2021).

1.2.3.3.2 Взаимодействие меланина и хлорофилла

Было показано, что накопление меланина в зерновке ячменя происходит в клетках перикарпа и цветковых чешуй, и паттерн локализации меланина совпадает с флюоресценцией хлорофилла (Рисунок 5). На основании этого был сделан вывод, что накопление меланина происходит в пластидах, которые получили название меланопласты (Shoeva et al., 2020).

Исследуя почти-изогенные линии ячменя с меланином в зерновке, с частичным альбинизмом перикарпа и цветковых чешуй, а также гибридной линии, характеризующейся одновременным накоплением меланина и отсутствием хлорофилла в оболочках зерновки, было выдвинуто предположение о том, что хотя процессы фотосинтеза и меланогенеза не связаны напрямую, существует определенная связь между функциональным состоянием пластид и синтезом меланина (Mursalimov et al., 2022). Показано, что отсутствие хлорофилла не препятствует развитию меланиновой пигментации у ячменя, однако замедляет её появление (Mursalimov et al., 2022). Наличие хлорофилла в оболочках семян не является необходимым для развития меланиновой пигментации и подтверждается тем, что меланин синтезируется в семенах, не подверженных воздействию солнечного света, например, у кунжута (Wang et al., 2020) или арбуза (Li et al., 2020; Mavi, 2010).

Тем не менее, показано, что синтез меланина не происходит в недифференцированных пластидах, в которых не развиты внутренние мембранные структуры – тилакоиды. Было показано, что в линии ячменя, характеризующейся отсутствием хлорофилла в цветковых чешуях и прикарпе, накопление меланина происходит преимущественно в цветковых чешуях, где пластиды имеют развитую внутреннюю структуру, схожую с контрольной линией. В то же время, пластиды в клетках перикарпа в целом остаются недифференцированными пропластидами, и накопление меланина в них не происходит (Mursalimov et al., 2022).

В процессе синтеза меланина у ячменя была показана постепенная деградация пластид, с характерным упрощением их внутренней структуры вплоть до полного разрушения. Однако, пластиды в перикарпе линии *i:VwBlp1* (синтезирует и меланин, и хлорофилл в зерновке) хоть и обладали характерными признаками распада пластид, такими как наличие концентрических мембран (Parra-Vega et al., 2015) и накопление пластоглобул (Wijk and Kessler, 2017), не разрушались полностью даже на самых поздних стадиях созревания колоса. Такая особенность строения пластид ограничивает распределение меланина и предопределяет округлую форму включений меланина в перикарпе (Рисунок 6). При этом, в цветковых чешуях наблюдалось полное разрушение структуры пластид по мере созревания зерновки, и меланин был распределен в виде бесструктурных клеточных включений (Mursalimov et al., 2022). О наличии процессов дегградации фотосинтетического аппарата и структуры пластид свидетельствуют также данные сравнительных транскриптомных исследований, где в линии, аккумулирующей меланин было отмечено снижение транскрипционной активности генов, связанных с такими терминами генной онтологии как «фотосинтез», «тилакоид», «фотосинтетическая мембрана», «фотосистема II» по сравнению с контрольной линией. Причем, снижение экспрессии данных генов происходило на стадии молочно-восковой спелости зерновки до появления меланиновой пигментации, что свидетельствует о том, что переход

от фотосинтезирующих хлоропластов к нефотосинтезирующим меланопластам является генетически детерминированным (Glagoleva et al., 2017; Vikhorev et al., 2021).

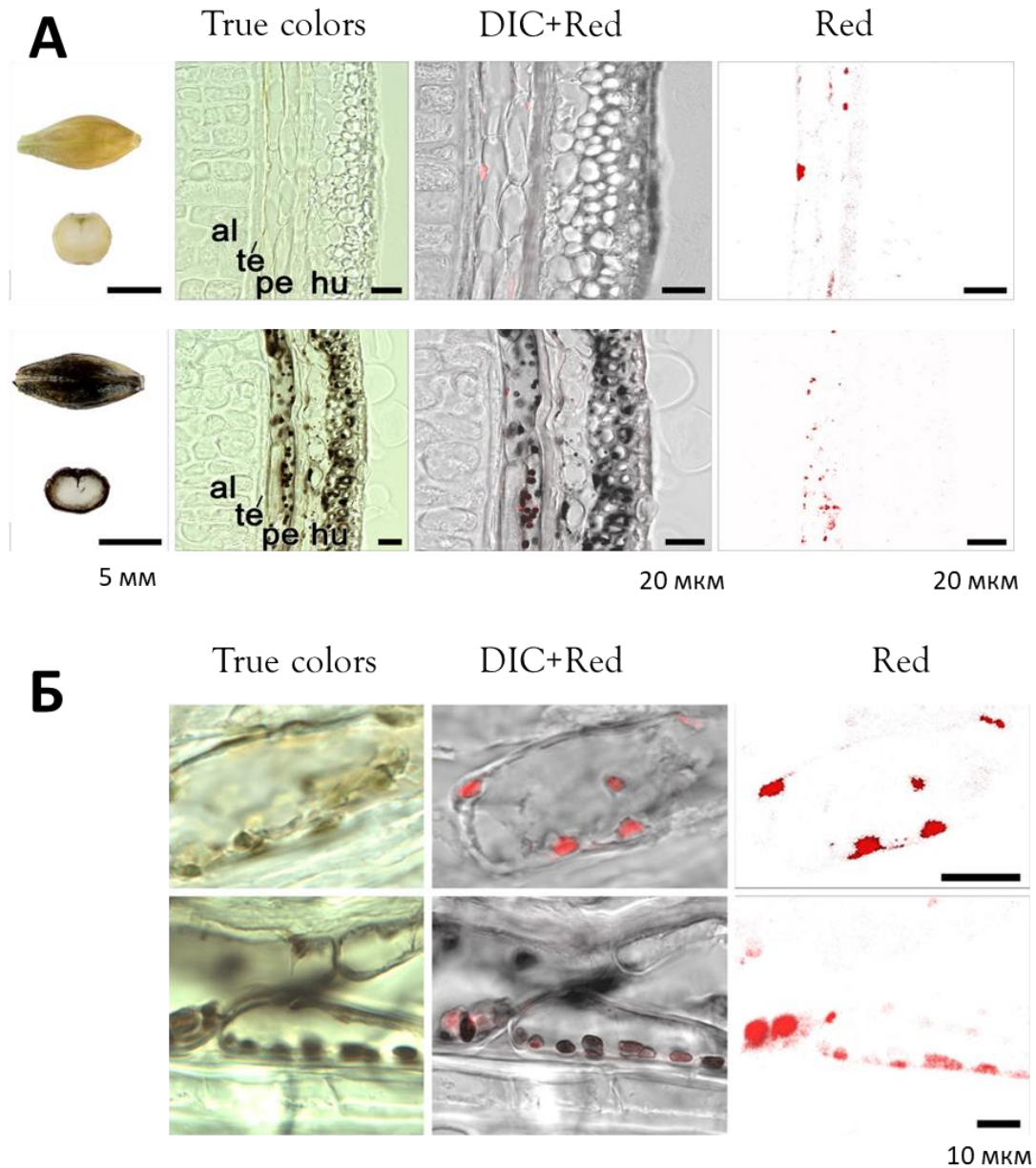


Рисунок 5. (А) Поперечные срезы зерен сорта Bowman (верхний ряд) и *i:BwBlp1* (нижний ряд) на поздней восковой стадии спелости из статьи Shoeva et al., 2020. True colors – реальное окрашивание срезов, DIC+Red – дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия с красной автофлуоресценцией хлорофилла, Red – автофлуоресценция хлорофилла. al – алейроновый слой, te – теста или оболочка зерна, pe – перикарп, hu – цветковая чешуя. (Б) Накопление меланина и хлорофилла в клетках перикарпа зерновки Bowman (верхний ряд) и *i:BwBlp1* (нижний ряд) на поздней восковой стадии спелости из статьи Shoeva et al., 2020.

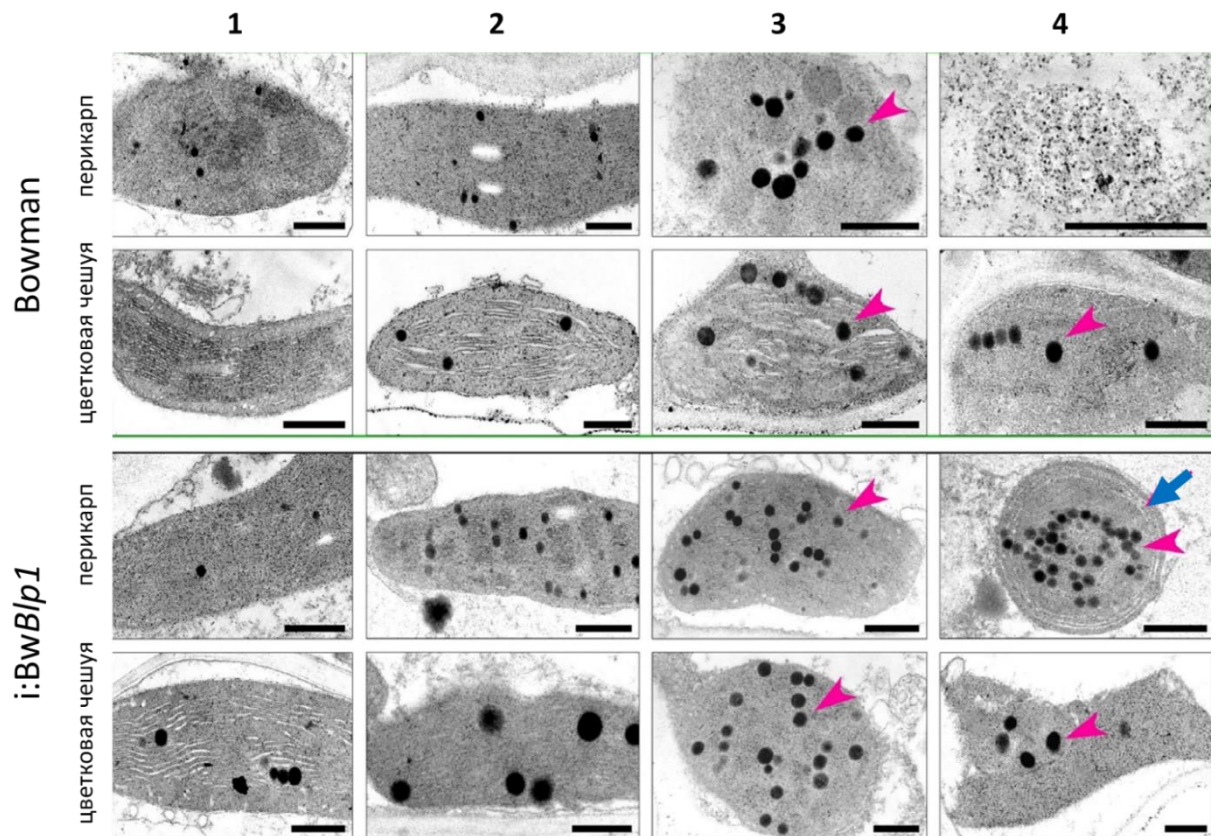


Рисунок 6. Ультраструктура пластид в перикарпе и цветковых чешуях Bowman и *i:BwBlp1* на разных стадиях созревания зерновки из статьи Mursalimov et al., 2022. 1 – молочно-восковая, 2 – ранняя восковая, 3 – восковая, 4 – поздняя восковая стадии спелости зерновки. Розовые стрелки указывают на пластоглобулы, голубая стрелка – на кольцевую мембранную структуру. Масштабная линейка – 0,5 мкм.

1.3. Полифенолоксидазы растений

1.3.1 Структура и функции полифенолоксидаз

Полифенолоксидазы (РРО) – это широко распространенные ферменты класса оксидоредуктаз, которые встречаются во всех царствах живых организмов. Общим для данного класса ферментов является высококонсервативный тирозиназный домен, содержащий два консервативных медь-связывающих домена: CuA и CuB (Marusek et al., 2006). Каждый из этих доменов содержит около 50 аминокислотных остатков, которые связаны линкерным регионом (около 100 а.о.). CuA более вариабелен, чем CuB, при этом изменения в домене CuA связаны с субстратной специфичностью фермента (Tran et al., 2012). Полифенолоксидазы могут проявлять два типа активности: монофенолазную активность (Е.С. 1.14.18.1), катализируя *o*-гидроксилирование монофенолов с образованием дифенолов и дифенолазную (Е.С. 1.10.3.), окисляя *o*-дифенолы до *o*-дихинонов (Nicolas et al., 1994). Затем *o*-дихиноны либо подвергаются неферментативной полимеризации, либо взаимодействуют с другими соединениями, такими как тиолы, аминокислоты, пептиды с образованием окрашенных продуктов; либо могут медленно взаимодействовать с водой, в результате чего образуются трифенолы или происходит восстановление до исходных фенолов (Рисунок 7) (Nicolas et al., 1994).

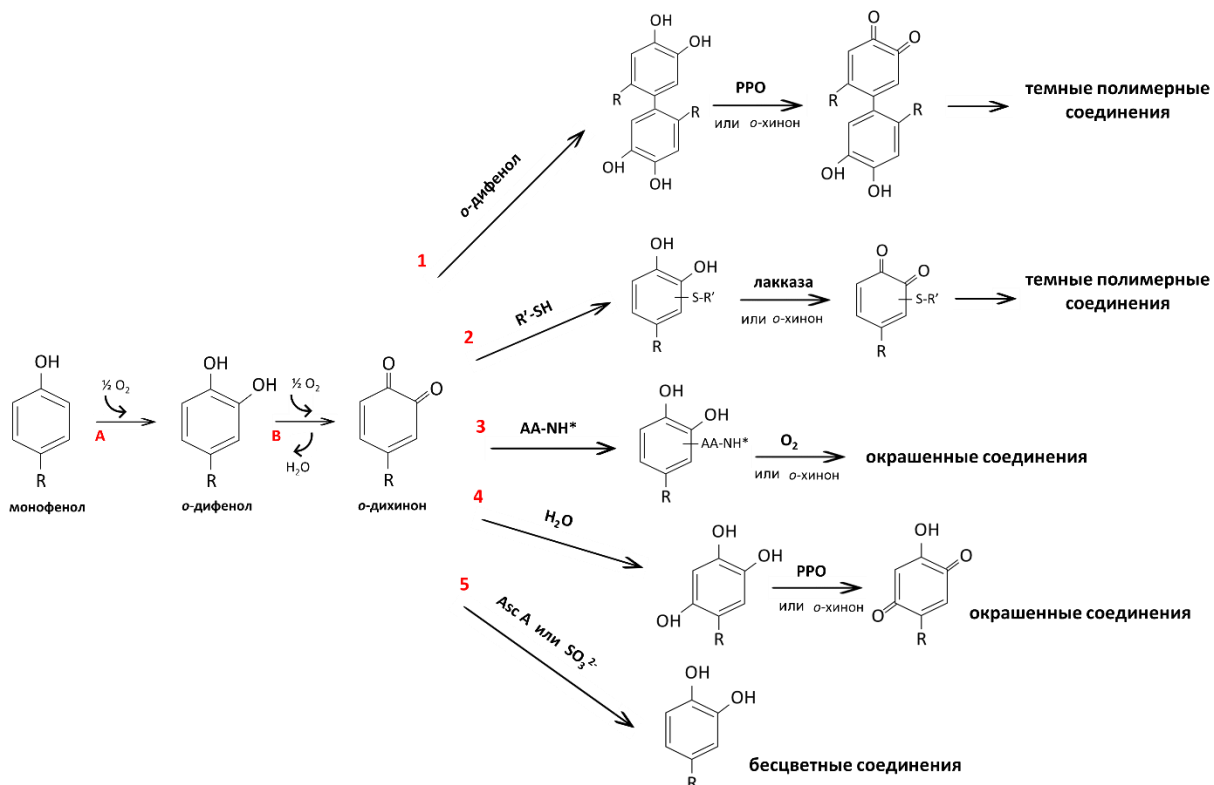


Рисунок 7. Реакции, катализируемые полифенолоксидазой (А и В), и реакции о-хинона (1-6) по Nicolas et al. (1994). Благодаря монофенолазной (или крезолазной) и дифенолазной (или катехолазной) активностям PPO гидроксилируют монофенолы до о-дифенолов (А) и впоследствии окисляют о-дифенолы до о-хинонов (В), соответственно. Образующиеся о-хиноны могут реагировать с другой молекулой фенола с образованием димеров исходного фенола (реакция 1). Эти димеры с о-дифенольной структурой могут быть окислены либо ферментативно, либо другим о-хиноном до темноокрашенных полимерных соединений. Путем нуклеофильного присоединения о-хиноны могут взаимодействовать с тиоловыми группами (реакция 2) или аминогруппами аминокислот или пептидов (реакция 3), в результате чего образуются соединения с о-дифенольной структурой, которые могут быть дополнительно окислены (лакказой или кислородом) или реагируют с избытком о-хинонов с образованием окрашенных продуктов. При добавлении воды происходит образование трифенолов, которые могут быть окислены PPO или о-хинонами с образованием п-хинонов (реакция 4). В результате реакции с аскорбиновой кислотой или сульфитами происходит восстановление исходного фенола (реакция 5). Все реакции являются неферментативными, за исключением реакций с лакказой и PPO. AA-NH* – аминокислоты или пептиды; Asc А – аскорбиновая кислота; R'-SH – малые тиоловые соединения (например, цистеин или глутатион).

Полифенолоксидазы разных видов растений могут проявлять различную субстратную специфичность, а также для разных PPO характерны различия в оптимальных температуре и рН, при которых фермент проявляет наибольшую активность (Jukanti, 2017). В целом, ферменты PPO являются активными в довольно широком спектре рН 4,0 – 8,0, однако, оптимальные значения рН

могут существенно варьировать как между видами, так и для разных РРО внутри одного вида. К примеру, РРО баклажана демонстрирует широкий оптимум pH в зависимости от монофенолазной или дифенолазной активности фермента. В случае монофенолазной активности наблюдался более широкий диапазон оптимума pH (5,0–6,5) при использовании в качестве субстратов 4-метилкатехола и трет-бутилкатехола, тогда как для дифенолазной активности наблюдался единичный максимум pH 7,5 при использовании п-крезола в качестве субстрата (Pérez-Gilabert and García Carmona, 2000). С другой стороны, РРО вишни и клубники имеют узкий оптимум pH ~4,5 и используют в качестве субстрата 4-метилкатехол (Wesche-Ebeling and Montgomery, 1990). Для РРО твердой и мягкой пшеницы, которые используют в качестве субстратов катехол и 4-метилкатехол, оптимальными являются более нейтральные значения pH – 6,5 и 6,9, соответственно (Altunkaya and Gökmen, 2012; Interesse et al., 1980). Температурный оптимум активности РРО варьирует в широком диапазоне от 15°C до 65°C и отличается у разных видов растений, а также зависит от субстрата, с которым взаимодействует фермент (Jukanti, 2017). Например, полифенолоксидаза шиповника проявляет более низкий температурный оптимум, вступая в реакцию с дифенолами, такими как катехол (25°C) и трифенолами (пирогаллол; 15°C) и более высокий температурный оптимум реагируя с монофенольными субстратами, такими как тирозин (65°C) и п-крезол (60°C) (Sakiroglu et al., 1996).

РРО растений участвуют в ответе на поранения, инвазию насекомых, патогенов и на другие биотические и абиотические стрессы. В результате нарушения клеточной компартментализации, ферменты РРО, локализованные в пластидах, вступают в реакцию с фенольными субстратами, локализованными в вакуолях. При этом происходит окисление моно- и дифенолов до высокореактивных дихинонов, которые полимеризуются с образованием черно-коричневых меланин-подобных соединений (Nicolas et al., 1994). Данный процесс получил название «реакция ферментативного потемнения» (enzymatic browning reaction). Помимо нежелательного

потемнения продуктов, дихиноны, образующиеся в ходе реакции способны ковалентно модифицировать аминокислоты и белки клетки (Mason and Peterson, 1965), а также вызывать выброс активных форм кислорода, токсичных для патогенов. Активные формы кислорода индуцируют гены иммунного ответа растений и увеличивают образование лигнина, изменяют структуру ДНК, окисляют фенольные соединения, липиды и белки, нарушая адсорбцию в пищеварительной системе насекомых и транспортные процессы (Yoruk and Marshall, 2003).

Поскольку РРО вызывают нежелательное потемнение продуктов, оказывая существенное негативное влияние на их потребительские качества, полифенолоксидазы являются одними из наиболее интенсивно изучаемых ферментов растений (Jukanti, 2017). В последнее время появляются новые данные о других возможных функциях РРО, помимо защитных функций при механическом нарушении целостности тканей растений. К примеру, нокаут единственного гена, кодирующего РРО у грецкого ореха, привел к появлению темных некротических пятен на листьях, что было связано с нарушением метаболизма тирозина и накоплением токсичного соединения тирамина в клетках (Araji et al., 2014). У картофеля, нокаут генов *Pro* также оказал существенное влияние на фенольный метаболизм, что привело к повышенному накоплению конечных продуктов пути биосинтеза фенилпропаноидов в мутантных линиях по сравнению с диким типом, и повышению их устойчивости к фитофторозу (Llorente et al., 2011, 2014). С другой стороны, сравнение мутантной популяции красного клевера с низкой активностью РРО в листьях с популяцией дикого типа показало, что отсутствие полифенолоксидазной активности не оказывает влияния на накопление фенольных соединений, однако, снижает жизнеспособность и урожайность растений (Voeskx et al., 2017). Поскольку РРО локализуется в хлоропластах, то обсуждается возможная роль полифенолоксидаз в процессе фотосинтеза и защите фотосинтетического аппарата от повреждений в условиях абиотического стресса (Voeskx et al., 2017).

1.3.2 Гены полифенолоксидаз растений

Гены, кодирующие PPO у растений, могут существенно отличаться друг от друга по структуре, но консервативные участки, кодирующие медь-связывающие домены CuA и CuB, N-концевой транзитный пептид, необходимый для закрепления PPO на внутренней мембране тилакоидов, и C-концевой домен обычно сохраняются у активно транскрибирующихся генов (Рисунок 8) (Tran et al., 2012). Размер семейств генов PPO может существенно варьировать у разных видов, достигая 13 генов *Ppo* у мха *Physcomitrella patens* и 11 генов у сои (*Glycine max*) и тополя (*Populus trichocarpa*) (Tran et al., 2012), или быть представленным единичным геном, например, у грецкого ореха (*Juglans regia*) (Araji et al., 2014), либо могут полностью отсутствовать в геноме растения, например, *Ppo* не были выявлены у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). (Jukanti, 2017).

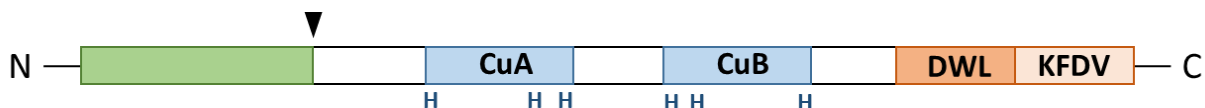


Рисунок 8. Схематичная структура пептида PPO согласно Tran et al., 2012. Содержит N-концевой транзитный пептид (зеленый), отщепление которого происходит по аланиновому мотиву (стрелочка); домены CuA и CuB, содержащие по три гистидина (H), необходимых для соединения с атомами меди; C-концевой домен (оранжевый), включающий домены DWL и KFDV, характерные для PPO высших растений.

При помощи филогенетического анализа в 25 геномах различных видов растений было показано, что такое разнообразие в размерах семейств генов *Ppo* является следствием независимых тандемных дупликаций, что также подтверждается хромосомной локализацией генов *Ppo* в виде кластера, характерной для многих видов растений (Tran et al., 2012). К примеру, гены, кодирующие полифенолоксидазу у растений семейства Пасленовые (*Solanaceae*), локализованы на хромосоме 8 и имеют один экзон. Однако, их

количество может варьировать у видов растений внутри семейства: от 6 генов *Ppo* у баклажана (*Solanum melongena*) до 9 генов у картофеля (*Solanum tuberosum*) (Taranto et al., 2017).

У злаков, количество генов, кодирующих *Ppo* может варьировать от двух генов у риса (*Oryza sativa*) до восьми генов у сорго (*Sorghum bicolor*) (Jukanti, 2017; Tran et al., 2012). У риса, один из генов, кодирующих полифенолоксидазу, известен также под названием *Phr1* (*phenol reaction 1*), нарушение функции которого связано с появлением фенол-негативного фенотипа (Yu et al., 2008). Семена риса, погруженные в раствор фенола или тирозина постепенно приобретают темный цвет за счет активности РРО, однако растения с неработающим геном *Phr1* не темнеют, т.е. демонстрируют фенол-негативный фенотип. Участие в фенольной реакции является важным таксономическим признаком для разделения двух подвидов риса. Известно, что семена подвида *indica* демонстрируют фенол-позитивную реакцию, в то время как семена подвида *japonica* не темнеют при воздействии фенола (Morishima and Oka, 1960). Причем, было показано, что данный признак имеет моногенное наследование, и только один из двух генов *Ppo* риса участвует в его формировании (Yu et al., 2008).

Изучение семейств генов полифенолоксидаз у других видов злаков также начиналось с картирования локусов, связанных с фенол-негативным фенотипом. Для мягкой и твердой пшеницы фенольная реакция была открыта в 1922 году и получила широкое применение как для классификации сортов, так и для определения качества зерна, поскольку продукты, полученные из зерен фенол-негативных сортов, не темнели со временем и дольше сохраняли потребительские качества (Bernier and Howes, 1994; Murukan et al., 2018). Было показано, что данный признак имеет моногенное наследование, и фенол-позитивный фенотип доминирует над фенол-негативным, источником которого является А-геном (Bhowal et al., 1969). Впоследствии у мягкой пшеницы были выявлены шесть генов, кодирующих РРО, локализованных на

гомеологичных хромосомах второй группы и разделены на две группы паралогов: *Ppo-1* и *Ppo-2* (Jimenez and Dubcovsky, 1999; Jukanti et al., 2004, 2006). Наибольшая активность РРО была связана с генами, локализованными на хромосоме 2А, хотя для некоторых сортов мягкой и твердой пшеницы была показана активность РРО, связанная с фенольной реакцией, обусловленной генами на хромосомах 2В и 2D (Jukanti, 2017). Более того, была показана активность РРО, связанная с другими группами хромосом пшеницы, в частности 3А и 4В (Jimenez and Dubcovsky, 1999).

У ячменя (*Hordeum vulgare* L.), локус *Phr* также связан с развитием фенол-негативного фенотипа и локализован на длинном плече хромосомы 2Н (Takeda and Lin Chang, 1996). Важно отметить, что в отличие от пшеницы и риса, фенол-негативный фенотип редко встречается у ячменя, и был выявлен только у пятидесяти одного образца среди более чем девяти тысяч проанализированных образцов как дикого, так и культурного ячменя (Takeda and Chang, 1996). Затем, два дублицированных гена *Ppo1* и *Ppo2*, кодирующих полифенолоксидазу, были выделены и картированы на длинном плече хромосомы 2Н в локусе *Phr* (Taketa et al., 2010). Было показано, что два этих гена обладают разными паттернами экспрессии в зерновке ячменя; ген *Ppo1* экспрессировался в остях и цветковых чешуях, в то время как ген *Ppo2* был транскрипционно активен в перикарпе. При этом, с фенольной реакцией связывают активность гена *Ppo1* (Taketa et al., 2010). Тем не менее, можно предположить наличие дополнительных генов *Ppo* на хромосомах 3Н и 4Н, исходя из данных, полученных на диком ячмене *Hordeum chilense* Roem. et. Schult (Rodríguez-Suárez and Atienza, 2014).

1.3.3 Роль полифенолоксидаз в синтезе меланина

Участие полифенолоксидаз в синтезе меланина в неповрежденных тканях растений на данный момент является неопределенным. До недавнего

времени считалось, что накопление меланина происходит в межклеточном пространстве, формируя фитомеланиновый слой (Pandey et al., 1989), что исключало бы участие в синтезе меланина РРО, локализованных в пластидах, и предполагало бы участие других ферментов, окисляющих фенолы, например, связанных с клеточной стенкой лакказ (Wang et al., 2015). Однако, локализация меланина в пластидах, являющихся производными хлоропластов, в зерновке ячменя (Shoeva et al., 2020), ставит под вопрос связь меланина и фитомеланинового слоя. Фитомеланиновый слой был описан как черный, твердый, устойчивый к действию растворителей материал, который заполняет межклеточные пространства между гиподермой и склеренхимой в перикарпе некоторых видов семейства *Asteraceae* (Pandey and Dhakal, 2001). Химическая структура фитомеланина до сих пор не определена. Некоторые авторы предполагают, что он не является меланином, и считают его производным поливиниловых ароматических спиртов (Pandey and Dhakal, 2001; Jana and Mukherjee, 2014). Однако одновременное присутствие фитомеланинового слоя и меланина в семенах некоторых видов, например, в шелухе подсолнечника (Thomas, 1955; Rogers and Kreitner, 1983; Gracheva and Zheltobryukhov, 2016), затрудняет их разделение. Поскольку образование меланина происходит внутриклеточно в пластидах (Shoeva et al., 2020), а внеклеточный фитомеланиновый слой формируется в результате разрушения гиподермальных клеток (Pandey and Dhakal, 2001), можно предположить, что синтез меланина и формирование фитомеланинового слоя – это разные клеточные процессы.

Тем не менее, данные о пластидной локализации меланина у ячменя, а также о присутствии фенольных субстратов РРО в хлоропластах (Zaprometov and Nikolaeva, 2003; Voesckx et al., 2017), позволяют предположить, что РРО является основным ферментом, участвующим в меланогенезе растений. О связи РРО с синтезом меланина также свидетельствуют молекулярно-генетические данные. У риса, черная окраска цветковых чешуй контролируется двумя комплементарными генами, один из которых *Phr1*,

кодирующий полифенолоксидазу, и *Bh4* (*black hull 4*), который кодирует транспортер тирозина (Fukuda et al., 2012), хотя стоит отметить, что темный пигмент в семенах риса так и не был определен как меланин при помощи вышеописанных физико-химических подходов. У арбуза, ген, кодирующий PPO, был недавно идентифицирован как ген-кандидат, ответственный за синтез меланина (Li et al., 2020). Также, повышенная экспрессия генов, кодирующих полифенолоксидазу, в семенах, накапливающих меланины, была выявлена в сравнительных транскриптомных исследованиях на арахисе (Wan et al., 2016), ячмене (Glagoleva et al., 2017) и кунжуте (Wang et al., 2020).

Заключение

Темная окраска семян является широко распространенным признаком у растений. Считается, что темная окраска является адаптивной, и может давать растениям определенные преимущества в условиях абиотического и биотического стресса. Для большинства растений такая окраска обусловлена пигментами фенольной природы, которые являются производными фенилаланина или тирозина. У ячменя, пигменты, принадлежащие к группе флавоноидов – антоцианы и проантоцианидины, накапливаясь в различных слоях зерновки, могут придавать семенам голубой, фиолетовый или желтый цвет. Тканеспецифический синтез пигментов флавоноидной природы находится под контролем транскрипционных факторов MYB, bHLH и WD40, которые образуя комплекс MBW, регулируют экспрессию структурных генов этого метаболического пути.

В то же время генетические механизмы, определяющие черную окраску семян растений, обусловленную накоплением меланина, остаются практически неизученными. Однако, в последние годы наблюдается значительный прогресс в изучении меланогенеза растений. К черным пигментам растений стал применим термин «меланин», который раньше

употреблялся в основном только по отношению к человеку и животным, были определены подходы для экстракции и идентификации меланина. Это способствовало окончательному разделению флавоноидов и меланинов, было показано, что две эти группы соединений обладают разной химической и генетической природой. Был выделен новый тип пластид, в которых происходит накопление меланина – меланопласты, а также предположено участие фермента полифенолоксидазы, локализованного в пластидах, в генетически детерминированном меланогенезе в тканях растений.

У ячменя, синтез меланина моногенно контролируется геном *Vlp1*, точная локализация и функция которого не были определены. Поэтому, основной задачей данного исследования стало точное ассоциативное картирование данного гена с привлечением материала биоресурсных коллекций ячменя ВИР и ИЦиГ СО РАН. Помимо этого, сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов, в почти-изогенных линиях ячменя в динамике развития колоса, позволит определить роль генов данного метаболического пути в синтезе меланина. Идентификация и анализ семейства генов полифенолоксидаз ячменя даст возможность проверить участие РРО в синтезе меланина в колосе ячменя.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Растительный материал, выделение ДНК

Для ассоциативного картирования гена *Blp1* на хромосоме 1Н, а также исследования возникновения и распространения аллелей, связанных с черной окраской колоса, были использованы образцы ячменя (*Hordeum vulgare* и *Hordeum spontaneum*) с темной окраской оболочек зерновки и с неокрашенной зерновкой, полученные из коллекции ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) (232 образцов), а также из коллекции ячменя ГенАгро (Институт цитологии и генетики СО РАН) (161 образец). Список образцов приведен в Приложении 1.

Для сравнительного анализа экспрессии генов, кодирующих РРО и ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов, была использована почти-изогенная линия ячменя *i:VwBlp1* (*'black lemma and pericarp 1'*, каталожный номер в коллекции NordGen NGB20470), характеризующаяся присутствием меланина в цветковой чешуе и перикарпе зерна, а также несущая вставку донорного фрагмента на хромосоме 1Н от сорта Jet (Druka et al., 2011). Данная линия получена на основе неокрашенного сорта Bowman (*'Bowman From Fargo'*, NGB22812), путем многократных бэккроссирующих скрещиваний. Линии были любезно предоставлены Др. Андреасом Бёрнером (IPK-Gatersleben, Германия).

Для проверки участия генов *Ppo* в синтезе меланина были использованы линии ячменя I677 и U004, полученные из Institute of Plant Science and Resources (Университет Окаяма, Япония, <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/>) и несущие рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2* (Taketa et al., 2010). На основе этих линий и почти-изогенной линии *i:VwBlp1* получены две популяции F₂: I677 x *i:VwBlp1* (202 растения), U004 x *i:VwBlp1* (124 растения).

Для выделения ДНК растения выращивались в условиях тепличного комплекса (ЦКП ЛИВР) ИЦиГ СО РАН с 12-часовым освещением в день при температуре 20-25°C в периоды осенней и весенней вегетаций, и в полевых условиях селекционно-генетического комплекса ИЦиГ СО РАН в период летней вегетации, а также в климатической камере «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH) с 12-часовым освещением в день при температуре 20°C. ДНК почти-изогенных линий, а также коллекций ячменя была выделена из листьев, согласно процедуре, описанной Plaschke et al. (1995). Для каждого образца коллекций ячменя выделение ДНК проводилось путем объединения материала из пяти растений; для генотипирования растений в популяциях F₂ выделение ДНК проводилось индивидуально из каждого растения.

2.2 Фенотипирование образцов с темной окраской зерновки

Для всех исследуемых образцов ячменя проводилось визуальное определение окраски зерновки. Определялся цвет цветковых чешуй для пленчатых образцов и цвет перикарпа у голозерных образцов. В случаях, когда визуальное определение окраски было затруднительным, пигментацию зерновки оценивали не только в зрелом зерне, но и в процессе его созревания и развития окраски. Для уточнения пигментного состава зерна проводились качественные реакции на антоцианы и меланины. Для этого, по 10 зерен каждого образца измельчались при помощи ручной мельницы, затем к навескам по 0.2 г добавляли по 1 мл 1% раствора HCl в метаноле для экстракции антоцианов и 2% раствор NaOH для определения меланинов. В случае присутствия антоцианов, раствор HCl в метаноле приобретал розовый цвет, а в случае присутствия меланинов наблюдалось почернение раствора при инкубации с NaOH.

2.3 Разработка ПЦР-маркеров и генотипирование

2.3.1 *In silico* анализ нуклеотидных последовательностей и разработка ПЦР-маркеров

Поиск полиморфных участков генов из локуса *Blp1* проводился в семи генотипах ячменя: два генотипа с черной окраской зерна и два неокрашенных генотипа, опубликованных Long et al., 2019, а также три отсеквенированных генотипа: Bowman, Morex и Barke, доступных на IPK Gatersleben (https://webblast.ipk-gatersleben.de/barley_ibsc/). Множественное выравнивание последовательностей проводилось с помощью программы MULTALIN 5.4.1 (Corpet, 1988). Для разработки маркеров к выбранным полиморфным сайтам была использована программа IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/>) Таблица с характеристиками праймеров приведена в Приложении 2.

2.3.2 Генотипирование коллекций и картирование гена *Blp1*

Генотипирование коллекций ячменя с черной окраской и неокрашенным зерном проводилось с использованием метода ПЦР с последующим разделением продуктов в агарозном геле, а также с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

ПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащей 100 нг ДНК-матрицы, 1X ПЦР буфер (67 mM трис-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, 18 mM (NH₄)₂SO₄), по 0.2 mM каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. Таг ДНК-полимеразы (Helicon, Москва), в следующих условиях: – 1 мин 50 сек при температуре 94°C, денатурация – 30 сек при 94°C, отжиг матрицы с праймерами – 30 сек при 55°C, полимеризация – 45 сек при 72°C, количество циклов – 45, достраивание ПЦР-фрагментов – 5 минут при 72°C. Характеристики используемых праймеров приведены в

Таблице 1. Визуализация продуктов ПЦР проводилась в 3% или 5% HR агарозном геле (HR Agarose PCR Grade, HydraGen, NJ, USA) с помощью системы документации гелей Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов был использован метод аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. К каждому из аллелей были разработаны 3'-специфичный прямой праймер, а также общий обратный праймер. Генотипирование коллекции данными маркерами проводилось на приборе QuantStudio 5 RealTime PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) с использованием набора SYNTOL SYBR Green I kit (Синтол, Москва, Россия). Полная или частичная комплементарность праймера к амплифицируемой последовательности определялась через показатель C_t .

В качестве контроля точности разделения аллелей, а также для выявления аллелей гена-кандидата на роль *Blp1* в коллекции ячменя, применялся метод секвенирования по Сенгеру. Для этого амплифицированные фрагменты выделяли из 1% агарозного геля с использованием набора diaGene для элюции ДНК из агарозного геля (ДиаМ, Россия). Секвенирующая реакция проводилась при помощи набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) с последующей детекцией на капиллярном секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Cetus) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Обработка результатов генотипирования, включая подсчет частот аллелей в коллекциях ячменя с меланином в зерне и без, определение значений χ^2 и p-value для каждого маркера, была выполнена при помощи программы Haploview (Barrett et al., 2005).

2.4 *In silico* анализ последовательностей генов

Поиск гомологичных последовательностей генов ячменя, а также других видов злаков осуществлялся при помощи алгоритма BLAST в базах данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Ensembl Plants (сборка генома ячменя IBSC v.2, выпуск 47, <https://plants.ensembl.org/index.html>). Множественное выравнивание последовательностей проводилось при помощи программы MUSCLE (Madeira et al., 2019). Предсказание структуры генов осуществлялось в программе FGENESH+ (Solovyev, 2004). Поиск функциональных доменов и функциональная аннотация генов проводилась с помощью базы данных InterPro (Mitchell et al., 2019). Моделирование третичной структуры предсказанных аминокислотных последовательностей выполнялось при помощи программы SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Для построения филогенетического дерева была использована программа MEGA X (Kumar et al., 2018), метод Neighbour-joining с бутстреп поддержкой 1000.

2.5 Анализ популяций F₂, несущих рецессивные аллели генов *Ppo*

Для проверки участия генов *Ppo* в синтезе меланина было проведен анализ популяций F₂, полученных в результате скрещиваний: I677 x i:Vw*Blp1*, U004 x i:Vw*Blp1*. Определение пигментации цветковых чешуй и перикарпа зерновки проводилось визуально, характер наследования признака оценивался при помощи критерия χ^2 . Для генотипирования образцов были использованы праймеры к генам *Ppo1* и *Ppo2* из статьи Taketa et al., 2010, а также праймеры к гену *Blp1*, показавшие наибольшее сцепление с признаком черной окраски зерновки в данной работе (Приложение 2).

2.6 Анализ экспрессии

2.6.1 Выделение РНК

Для анализа экспрессии была выделена РНК линии *i:VwBlp1* и сорта Bowman в coleoptile, корнях, листьях, стеблях, развивающихся колосках, перикарпе и цветковых чешуях. Для выделения РНК из корней и coleoptile семена проращивали в климатической камере «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH) при температуре 20°C с 12-ти часовым освещением в день. РНК выделяли на стадии пятидневных проростков. Для выделения РНК из листьев, стеблей, развивающихся колосков, цветковых чешуй и перикарпа растения были выращены в ЦКП ЛИВР ИЦиГ СО РАН в условиях 12-часового светового дня при температуре 20-25°C. Образцы РНК из листьев были получены на стадии кущения (25-й день после посева, ВВСН (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry) код 22), из стеблей – на стадии удлинения стебля (46-й день после посева, ВВСН код 37), из развивающихся колосков на стадии выхода в трубку (46-й день после посева, ВВСН код 49), из перикарпа зерна и цветковых чешуй колоса на молочно-восковой (67-й день после посева, ВВСН код 77) и восковой (71-й день после посева, ВВСН код 83) стадиях спелости. Образцы РНК были выделены в трех биологических повторностях, каждая биологическая повторность получена путем объединения материала с трех различных растений. Выделение проводилось с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), включая стадию обработки ДНКазой I (QIAGEN RNase-Free DNase Set). Концентрацию РНК в конечном растворе определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000/c (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

2.6.2 ПЦР в режиме реального времени

кДНК была синтезирована из 1 мкг суммарной РНК с помощью обратной транскрипции, используя (dT)₁₅ праймер и набор реагентов RevertAid™ kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора SYNTOL SYBR Green I kit (Синтол, Москва, Россия) согласно протоколу, рекомендованному производителем. Амплификация осуществлялась на приборе QuantStudio 5 RealTime PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). В качестве внешнего контроля была взята экспрессия гена *Actin* (von Zitzewitz et al., 2005). Каждая реакция проведена в трех технических повторностях. Подсчет относительного уровня экспрессии проводился с помощью метода dCt (Schmittgen and Livak, 2008). Достоверность отличий в уровнях экспрессии определялась при помощи теста Манна-Уитни (U-test) в программе STATISTICA 6.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выявление гена-кандидата, контролирующего признак черной окраски колоса ячменя

3.1.1 *In silico* анализ полиморфных участков в локусе *Blp1* и разработка ПЦР-маркеров

Для выявления гена из локуса *Blp1*, контролирующего формирование меланина в колосе ячменя, в данной работе применялся метод ассоциативного картирования. Для этого был проведен анализ частоты встречаемости полиморфизмов из данного локуса в коллекциях ячменя с черной и с неокрашенной зерновкой для последующего поиска ассоциаций полиморфизмов с наличием окраски. На данный момент в локусе *Blp1* предсказан 21 ген (Long et al., 2019), причем, многие из них являются генами с неизвестной функцией (Таблица 1).

Таблица 1. Гены, предсказанные в локусе *Blp1* (согласно Long et al., 2019). Гены, к которым были разработаны маркеры, выделены цветом.

№	Позиция гена на хромосоме		Название гена	Описание функции
	Начало гена	Конец гена		
1	537853387	537855444	HORVU1Hr1G086680	ДНК-связывающий транскрипционный фактор
2	537863644	537867161	HORVU1Hr1G086690	убиквитин-конъюгированный фермент
3	537927379	537929246	HORVU1Hr1G086710	гиберреллин-2-оксидаза
4	538027910	538028853	HORVU1Hr1G086750	белок, участвующий в снижении хлорореспирации 31
5	538112693	538114398	HORVU1Hr1G086760	3-кетоацил-СоА-синтаза 5
6	538129366	538130155	HORVU1Hr1G086780	функция неизвестна
7	538135107	538135937	HORVU1Hr1G086790	функция неизвестна
8	538165644	538167079	HORVU1Hr1G086810	гиберреллин-2-оксидаза
9	538354329	538354592	HORVU1Hr1G086850	функция неизвестна
10	538376764	538378072	HORVU1Hr1G086870	функция неизвестна
11	538382554	538386693	HORVU1Hr1G086890	β-фруктофуранозидаза
12	538390618	538391311	HORVU1Hr1G086900	кальмодулин-подобный белок 43
13	538410294	538411437	HORVU1Hr1G086910	функция неизвестна
14	538415191	538416824	HORVU1Hr1G086920	цитохром P450
15	538422799	538426687	HORVU1Hr1G086930	формин-подобный белок
16	538479086	538482522	HORVU1Hr1G086970	функция неизвестна
17	538479944	538489715	HORVU1Hr1G086980	3-дезоксимагно-октулозонатцитидилтрансфераза
18	538502209	538505728	HORVU1Hr1G087010	фиолетовая кислая фосфатаза 27
19	538509273	538509396	HORVU1Hr1G087020	кальций-зависимая протеинкиназа
20	538553991	538555536	HORVU1Hr1G087040	шаперон DnaJ
21	538582520	538585595	HORVU1Hr1G087050	рецептор-подобная протеинкиназа 4

Поиск полиморфных районов осуществляется при помощи *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей данного локуса у семи генотипов ячменя: двух черноокрашенных (W1, X1) и двух неокрашенных (Baudin, Metcalfe) из статьи Long et al., 2019, а также у трех сортов с неокрашенным зерном: Bowman, Morex, Barke, геномные последовательности которых находятся в открытом доступе в базе данных IPK. Выявление подходящих полиморфизмов производилось следующим образом: последовательности генов, включая сцепленные с ними последовательности – в среднем по 2000 п.н. в 5'- и 3'-некодирующих областях, выравнивались для семи вышеуказанных генотипов. Затем, выбирались такие полиморфизмы, которые, во-первых, были представлены, т.е. наблюдались хотя бы в двух генотипах, и, во-вторых, были удобны для детекции при помощи электрофореза в агарозном геле (инсерции/делеции от 6 п.н. и более) или при помощи аллель-специфичной ПЦР (однонуклеотидные замены). Далее к выбранным полиморфным участкам были разработаны ПЦР-маркеры для генотипирования коллекций черного и неокрашенного ячменя. Для детекции инсерций/делеций были подобраны праймеры, фланкирующие выбранный полиморфизм, но при этом сами последовательности праймеров являлись консервативными для всех семи генотипов. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов были разработаны праймеры со специфичным 3'-концом для каждого аллеля и общий обратный праймер, детекция результатов проводилась при помощи аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Для дальнейшего анализа использовались только биаллельные ПЦР-маркеры, которые затем были условно обозначены буквами А и В. Если в ходе генотипирования коллекций выявлялись дополнительные аллели, то такие маркеры исключались из дальнейшего анализа. В итоге, были выбраны девять ПЦР-маркеров: шесть были разработаны в ходе данной работы, а также три InDel маркера были выбраны из статьи Long et al., 2019, которые целиком охватывают локус *Vlp1*. Характеристики маркеров приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Характеристики ПЦР-маркеров. Маркеры MC_1570156, MC_42987, MC_488351 взяты из статьи Long et al., 2019.

Название гена/маркера	Позиция 3'-конца прямого праймера на хромосоме 1Н	Обозначение аллелей	
		Аллель А	Аллель В
MC_1570156	537854953	делеция ~6bp	нет делеции
HORVU1Hr1G086710	537930267	делеция 15bp	нет делеции
HORVU1Hr1G086760	538112126	делеция 15bp	нет делеции
HORVU1Hr1G086780	538129479/538129481	SNP: G	SNP: C
MC_42987	538130584	делеция 10bp	нет делеции
MC_488351	538131255	делеция 42bp	нет делеции
HORVU1Hr1G086790	538135113	делеция 28bp	нет делеции
HORVU1Hr1G086930	538426060	нет делеции	делеция 11bp
HORVU1Hr1G087050	538583765	нет делеции	делеция ~6bp

3.1.2 Подбор и тестирование растительного материала для ассоциативного картирования

Для проведения ассоциативного картирования гена *Vlp1* было необходимо подобрать достаточное количество образцов ячменя с черной окраской зерна и с неокрашенным зерном, а также убедиться в том, что черная окраска обусловлена именно меланином, а не другими пигментами фенольной природы – антоцианами и проантоцианидинами. Еще одним важным критерием подбора материала была его генетическая разнородность, подразумевающая различное географическое происхождение образцов.

Основную часть образцов с неокрашенным зерном составили образцы из коллекции ячменя ИЦиГ СО РАН, а образцы с темной окраской зерновки были получены преимущественно из коллекции ячменя ВИР. Таким образом, для дальнейшего анализа было выбрано 232 образца из коллекции ВИР, включая 6 образцов дикого ячменя (*Hordeum spontaneum* Koch.), и 161 образец из коллекции ИЦиГ СО РАН.

Для уточнения пигментного состава зерна были использованы качественные реакции на антоцианы и меланин (Приложение 3). В качестве контроля были взяты почти-изогенные линии ячменя с известным пигментным составом. Результаты фенотипирования образцов с помощью качественных реакций представлены в таблице с описанием материала. Однако, важно отметить, что при добавлении щелочи происходит окисление не только меланина, но и проантоцианидинов, накапливающихся в семенной оболочке и в норме всегда присутствующих в зерне ячменя, поэтому определение присутствия меланина по интенсивности полученного раствора в некоторых случаях может быть затруднено. В таких случаях проводили наблюдение за появлением и развитием окраски зерновки в процессе созревания колоса. Поскольку появление антоциановой и меланиновой пигментации у ячменя происходят на разных стадиях спелости зерна – молочно-восковой и ранней восковой, соответственно, то таким образом можно определить обусловлена ли темная окраска зерновки только антоцианами, накапливающимися в перикарпе зерна и/или в алейроновом слое, или совместным накоплением антоцианов и меланинов. Таким образом, используя данные методы, для 207 образцов ячменя было определено присутствие меланина в оболочках зерна, а для 186 образцов было показано его отсутствие.

3.1.3 Генотипирование коллекции и поиск ассоциаций с черной окраской колоса

Для дальнейшего анализа из отобранных образцов была выделена ДНК путем объединения материала из пяти растений для исключения возможной неоднородности внутри образца. Генотипирование коллекции проведено для девяти ПЦР-маркеров, указанных выше. В Таблице 3 приведены частоты аллелей для каждого из маркеров в группах окрашенного (черные) и

неокрашенного (белые) ячменя в генотипированных образцах, а также это отображено с помощью схемы в Приложении 4.

Таблица 3. Частоты аллелей в образцах с черной и белой окраской колоса.

Название гена/маркера	% генотипированных образцов	Черные		Белые		χ^2	p-value
		A,%	B,%	A,%	B,%		
MC_1570156	95,9	4,5	95,5	42,9	57,1	159,704	1,313*10-36
HORVU1Hr1G086710	92,1	100	0	66,7	33,3	154,862	1,5*10-35
HORVU1Hr1G086760	97,5	1,5	98,5	78,7	21,3	485,242	1,546*10-107
HORVU1Hr1G086780	94,4	0	100	96,1	3,9	679,981	6,745*10-150
MC_42987	96,2	1	99	40,7	59,3	191,88	1,235*10-43
MC_488351	92,1	0,5	99,5	57,2	42,8	302,873	7,796*10-68
HORVU1Hr1G086790	93,9	45,7	54,3	0	100	215,918	7,027*10-49
HORVU1Hr1G086930	98,2	100	0	85,7	14,3	62,495	2,671*10-15
HORVU1Hr1G087050	90,8	27,3	72,7	39,3	60,7	11,471	7*10-4

Важно отметить, что для каждого из маркеров аллель был определен не для всех образцов, но не менее, чем для 90% образцов. Это объясняется тем, что аллели, которые определялись как «гетерозиготы» исключались из общего анализа, поскольку материал коллекций является неоднородным и может содержать примеси.

Из таблицы видно, что аллели маркера к гену *HORVU1Hr1G086780* наиболее связаны с наличием или отсутствием черной окраски колоса, по сравнению с остальными. У данного маркера аллель А представлен в 96,61% образцов с неокрашенным колосом, а аллель В в 100% образцов с черной окраской колоса. Среди проанализированных образцов по данному маркеру несоответствие аллеля и фенотипа наблюдалось только у семи образцов, для которых был выявлен аллель В, но при этом наличие меланина не было определено. Такое несоответствие может быть связано с неоднородностью исследуемого материала, включающей наличие примесей в образцах, а также наличием определенной погрешности, которые могут давать вышеописанные методы фенотипирования и генотипирования. Тем не менее, для маркера к гену *HORVU1Hr1G086780* наблюдается наибольшее значение χ^2 равное

679,981 при наименьшем значении p-value. Таким образом, можно заключить, что данный участок локуса *Blp1* ассоциирован с исследуемым признаком.

3.2 Анализ гена HORVU1Hr1G086780 – кандидата на роль *Blp1*

3.2.1 Определение структуры и функции гена

Поскольку выявленный ген-кандидат ранее не был аннотирован в геноме ячменя, то сначала было необходимо определить структуру гена, а также выявить предполагаемую функцию белка, который он кодирует. Для этого, при помощи программы FGENESH+ были предсказаны старт начала транскрипции, старт-кодон и стоп-кодон, сайт полиаденилирования (Рисунок 9) Данный ген представляет собой последовательность 681 п.н., включая 5`- и 3`- нетранслируемые районы длиной 172 п.н. и 242 п.н., соответственно. Белок-кодирующая последовательность имеет длину 267 п.н. и не содержит интронов.

Аннотация функции гена проводилась при помощи терминов генной онтологии (ГО) и базы данных InterPro. Было предсказано, что данный ген кодирует пептид длиной 88 аминокислот из семейства CLAVATA3/ESR (CLE) (InterPro ID IPR039616) и содержит N-концевой сигнальный пептид, содержащий 27 аминокислот, а также участок пептида с 28 по 88 а.о. является областью, локализованной во внеклеточном пространстве во время закрепления пептида на мембране, и включающей C-концевой CLE-домен, который содержит консервативную последовательность из 13 аминокислот (Рисунок 9).

Также для данного гена было выявлено четыре термина ГО, связанных с его клеточной локализацией и функцией (Таблица 4). Таким образом, данный ген кодирует сигнальный CLE-пептид, который является интегрированным компонентом клеточной мембраны (GO:0016021, GO:0016020), участвует в связывании рецепторов серин/треонин киназы (GO:0033612), а также в

передаче сигналов между клетками, участвующими в определении судьбы клетки (GO:0045168).

Таблица 4. Термины генной онтологии (ГО), связанные с геном HORVU1Hr1G086780

Номер термина ГО	Название термина ГО	Домен ГО
GO:0016021	встроенный компонент мембраны	клеточный компонент
GO:0033612	связывание рецепторов серин/треонин киназы	молекулярная функция
GO:0045168	передача сигналов между клетками, участвующими в определении судьбы клетки	биологический процесс
GO:0016020	мембрана	клеточный компонент

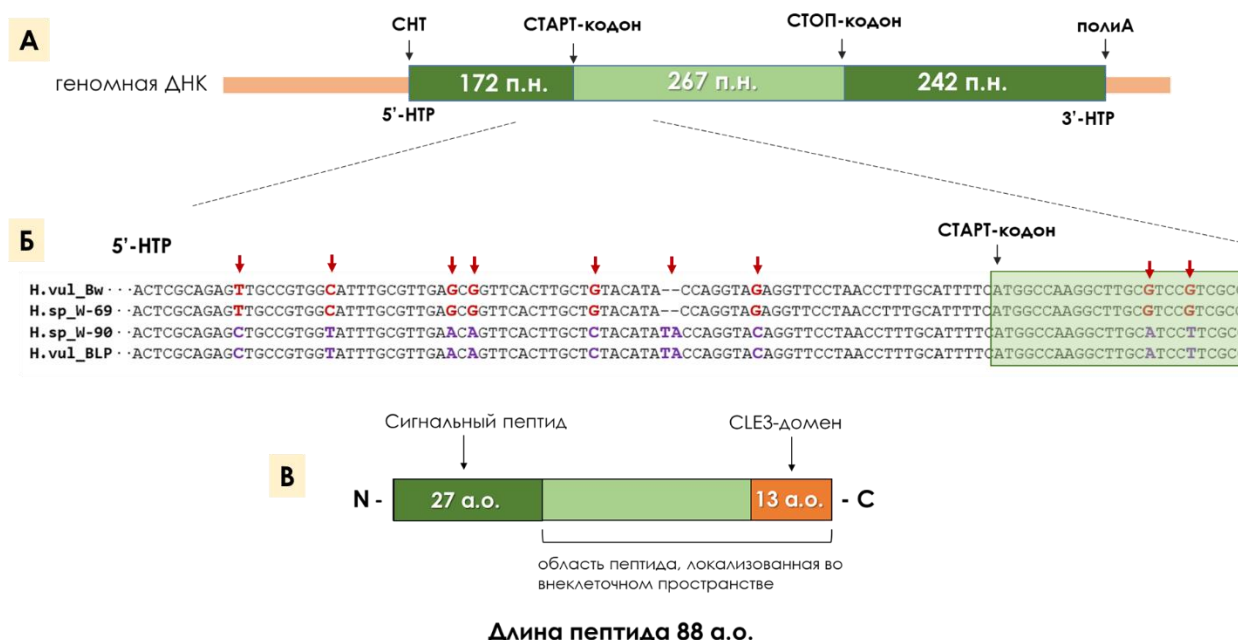


Рисунок 9. (А) Структура гена *HORVU1Hr1G086780*. СНТ – сайт начала транскрипции, полиА – сайт полиаденилирования, 5'- и 3'- НТР – 5'- и 3'-нетранслируемые районы. (Б) Фрагмент нуклеотидной последовательности гена *HORVU1Hr1G086780*, секвенированной в двух генотипах ячменя *H.vulgare*: Bw – Bowman (белое зерно, BLP – *i:BwBlp1* (черное зерно), и в двух генотипах дикого ячменя *H.spontaneum*: W-69 (белое зерно) и W-90 (черное зерно). Красными стрелками обозначены полиморфизмы, которые ассоциированы с наличием меланина в зерне. (В) Структура пептида, который кодирует ген *HORVU1Hr1G086780*.

3.2.2 Секвенирование и поиск аллелей гена в различных образцах коллекции ячменя

С целью выявления аллелей гена-кандидата в различных образцах коллекции ячменя, нуклеотидная последовательность данного гена была

секвенирована в 24 образцах ячменя *Hordeum vulgare* с неокрашенным зерном и в 20 образцах с меланином в зерне, а также в 6 образцах дикого ячменя *Hordeum spontaneum*, 5 из которых имеют черное зерно и 1 образец с неокрашенным зерном. Также для дальнейшего выравнивания последовательностей гена были добавлены последовательности генотипов ячменя Baudin, Metcalfe, W1, X1 из статьи Long et al., 2019; Morex, Bowman, Barke из базы данных IPK и Haruna Nijo из базы данных NCBI (AK370999). Полное выравнивание последовательностей представлено в Приложении 5. На Рисунке 9 (Б) представлено выравнивание 5'-фрагмента нуклеотидной последовательности гена для двух генотипов ячменя *H. vulgare*: Bw – Bowman (белое зерно), BLP – i:BwBlp1 (черное зерно), и в двух генотипах дикого ячменя *H. spontaneum*: W-69 (белое зерно) и W-90 (черное зерно). Было выявлено девять полиморфизмов, которые наследуются сцеплено и отличаются у черного и белого ячменя во всех исследуемых образцах. Семь из девяти представлены однонуклеотидными полиморфизмами, а также одной двунуклеотидной инсерцией ТА, наблюдаемой у черноокрашенных образцов, в 5'-нетранслируемой области гена. Еще два однонуклеотидных полиморфизма локализованы в белок-кодирующей области гена. Один из них находится в первой позиции шестого кодона и приводит к замене валина (Val) на изолейцин (Ile), которые относятся к неполярным аминокислотам, второй – в третьей позиции седьмого кодона и приводит к замене класса аминокислоты – основного аргинина (Arg) на неполярный лейцин (Leu).

Важно отметить, что вышеописанные замены были выявлены для всех 58 генотипов ячменя вне зависимости от их географического происхождения и были ассоциированы с наличием или отсутствием меланиновой окраски. Исходя из этого, можно предположить, что выявленные девять совместно наследуемых замен формируют два гаплотипа, один из которых характерен для образцов ячменя с меланином, а второй для образцов без меланина. Поскольку, гаплотип, характерный для образцов с меланином наблюдался как у культурного ячменя различного географического происхождения, так и у

дикого ячменя, можно сделать вывод о его монофилетическом происхождении.

3.2.3 Анализ экспрессии гена-кандидата в почти-изогенных линиях ячменя

Был проведен сравнительный анализ транскрипционной активности гена *HORVU1Hr1G086780* в почти-изогенной линии *i:BwBlp1* и родительском сорте Bowman в следующих органах: coleoptиле и корнях на стадии пятидневных проростков, листе на стадии кущения, стебле на стадии элонгации стебля, в развивающемся колосе на стадии выхода в трубку, а также в перикарпе и цветковых чешуях зерна на молочно-восковой и ранней восковой стадиях спелости зерна. Можно отметить, что данный ген является транскрипционно активным у ячменя, причем наибольший уровень экспрессии наблюдается в корнях на стадии проростков (Рисунок 10). В колосе наблюдаемая экспрессия данного гена примерно на порядок ниже, чем в корнях, и в целом может рассматриваться как фоновая. Однако в колосе наблюдалась значимо повышенная экспрессия в Bowman по сравнению с *i:BwBlp1* на стадиях молочно-восковой и ранней восковой спелости зерна, что может быть связано с изменением активности данного гена в процессе синтеза меланина.

HORVU1Hr1G086780
Blp1-кандидат

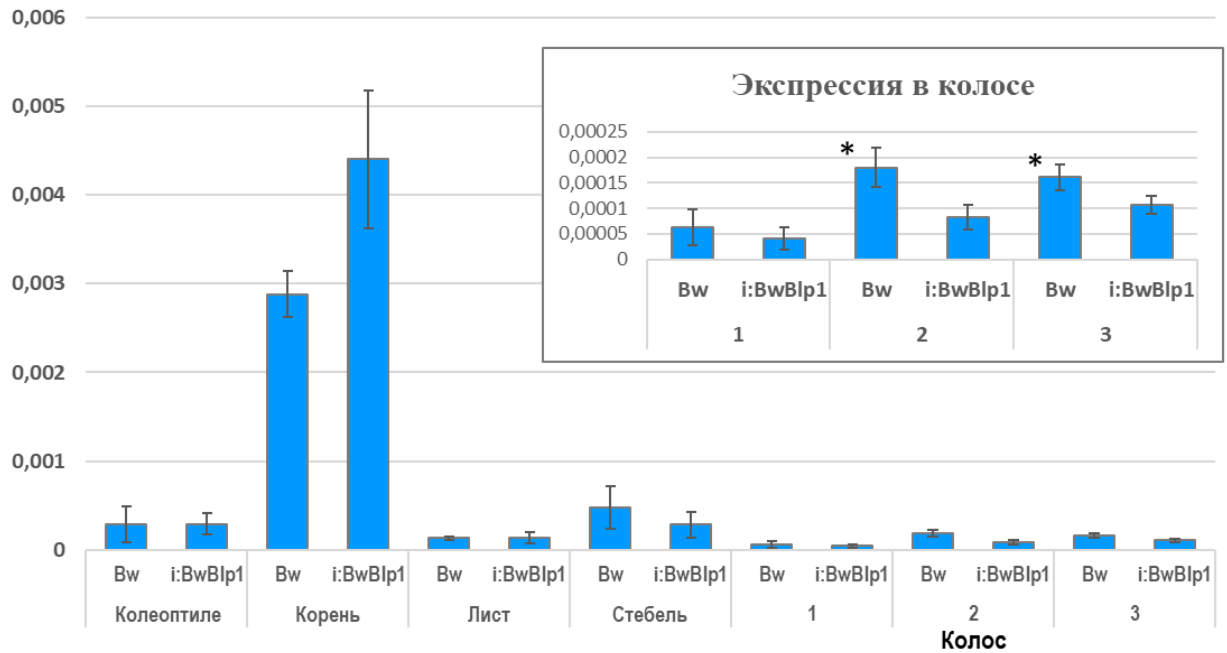


Рисунок 10. Относительный уровень экспрессии гена *HORVU1Hr1G086780* в различных органах ячменя. 1 – развивающийся колос на стадии выхода в трубку, 2 – стадия молочно-восковой спелости зерна, 3 – стадия ранней восковой спелости зерна. Планки погрешности отражают стандартное отклонение. * - отличия являются статистически значимыми (U-test, $p < 0,05$) между линией *i:BwBlp1* и Bowman на соответствующей стадии развития.

3.3 Анализ экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов в почти-изогенных линиях ячменя, контрастных по наличию меланиновой окраски зерновки

Для проверки наличия специфичной регуляции локусом *Blp1* генов пути биосинтеза фенилпропаноидов, в рамках данной работы проводится анализ экспрессии ключевых генов данного метаболического пути в почти-изогенной линии ячменя с меланином в зерновке и неокрашенном сорте Bowman в динамике развития колоса. Проведен сравнительный анализ экспрессии трех генов, кодирующих ферменты фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат-4-гидроксилазу (C4H) и 4-кумарат:КоА лигазу (4CL). Данные ферменты осуществляют три начальных реакции данного пути, которые являются общими для всех фенилпропаноидов. Также в анализ были включены гены, кодирующие ферменты начальных этапов биосинтеза монолигнолов: гидроксицинамоил-КоА трансферазу (HCT), шикимат-3'-гидроксилазу (C3'H). Для каждого из этих генов были разработаны праймеры для оценки суммарной экспрессии. Для анализа паттерна экспрессии O-метилтрансферазы кофейной кислоты (COMT) были разработаны специфичные праймеры к гену *HORVU1Hr1G011930*, повышенная экспрессия которого в черноокрашенном ячмене была описана ранее в статье Glagoleva et al., 2017, поскольку из-за обширности семейства генов O-метилтрансфераз у ячменя суммарная оценка экспрессии может быть затруднена. Результаты анализа представлены на Рисунке 11.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что в развивающемся колосе происходит активация всех вышеуказанных генов вне зависимости от наличия меланина в зерне, за исключением гена *Comt*. Однако, в линии *i:WwBlp1* наблюдается значимо повышенный уровень экспрессии генов *Pal*, *C4h*, *4Cl* и *C3'h* на стадии ранней восковой спелости (и на молочно-восковой спелости для гена *Pal*) по сравнению с Bowman на той же стадии.

Это может свидетельствовать о наличии вторичной активации ключевых ферментов данного пути в процессе меланогенеза.

Более того, для гена *Comt* наблюдалось наличие экспрессии только в линии *i:BwBp1*, которая увеличивается по мере созревания колоса, однако в колосе Bowman экспрессия данного гена не была выявлена. Можно предположить наличие специфической активации гена *Comt* геном *Bp1*, и участие данного гена в процессе биосинтеза меланина.

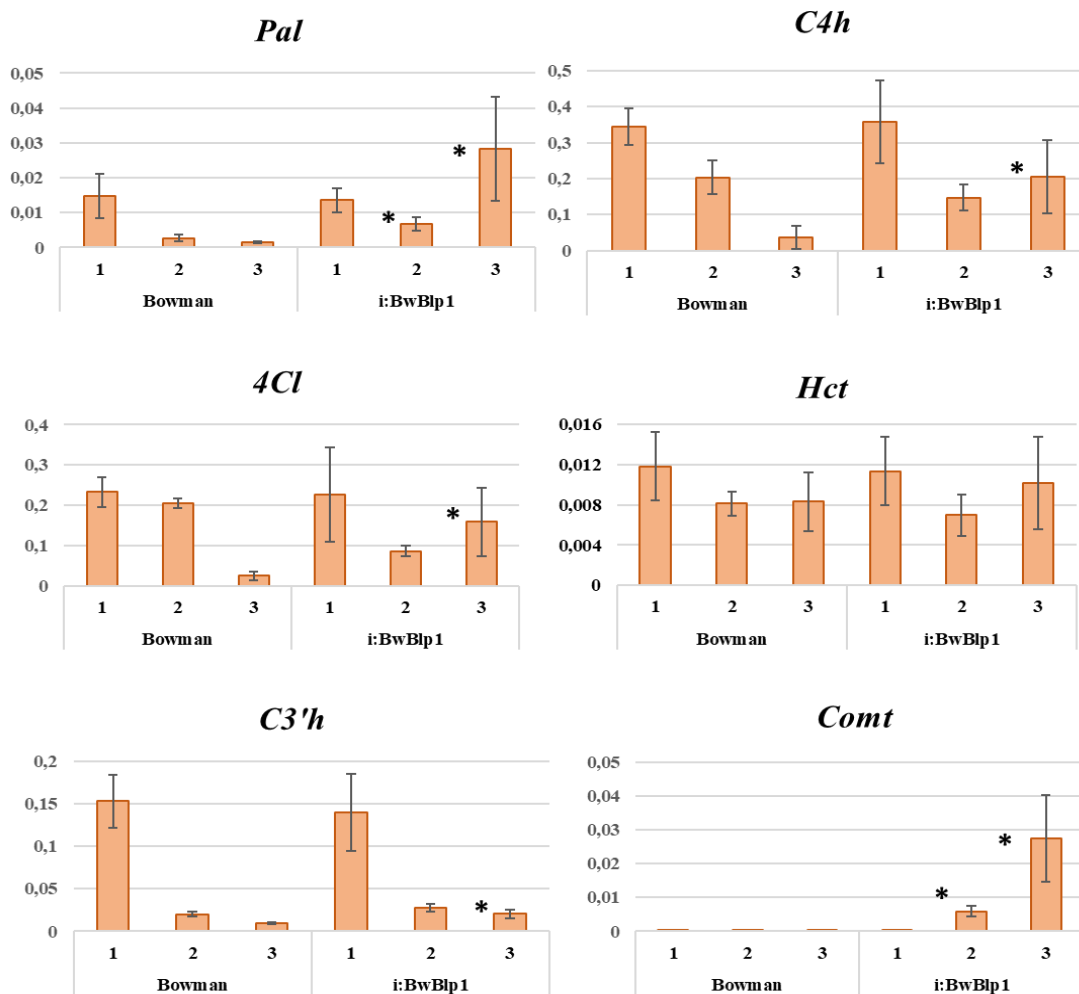


Рисунок 11. Относительный уровень экспрессии генов *Pal*, *C4h*, *4Cl*, *Hct*, *C3'h*, *Comt* в динамике созревания колоса ячменя. 1 – развивающийся колос на стадии выхода в трубку, 2 – стадия молочно-восковой спелости зерна, 3 – стадия ранней восковой спелости зерна. Планки погрешности отражают стандартное отклонение. * - отличия являются статистически значимыми (U-test, $p < 0,05$) между линией *i:BwBp1* и Bowman на соответствующей стадии развития.

3.4 Анализ семейства генов полифенолоксидаз (*Ppo*) ячменя

3.4.1. Идентификация генов семейства полифенолоксидаз ячменя и их структурная организация

На основании известных последовательностей генов *Ppo1* (NCBI: AB549330) и *Ppo2* (NCBI: AB549331) с использованием алгоритма BLAST в базе данных EnsemblPlants по гомологии с консервативным тирозиназным доменом в геноме ячменя были идентифицированы еще два гена полифенолоксидазы: *HORVU3Hr1G077790*, локализованный в дистальном районе длинного плеча хромосомы 3Н, и *HORVU4Hr1G090870*, локализованный в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4Н. Данные гены были обозначены *Ppo3* и *Ppo4*, соответственно.

Основываясь на предсказании структуры гена в EnsemblPlants и при помощи FGENESH+ было установлено, что длина нуклеотидной последовательности гена *Ppo3* составляет 2084 п.н., из которых 1743 п.н. – область гена, кодирующая пептид длиной 581 а.о., а также 5'- и 3'-нетранслируемые районы длиной 115 п.н. и 226 п.н., соответственно. В структуре гена *Ppo3* не было обнаружено интронов (Рисунок 12). Длина нуклеотидной последовательности гена *Ppo4* составляет 2851 п.н., включая 5'- и 3'-нетранслируемые районы длиной 53 п.н. и 621 п.н., соответственно. В белок-кодирующей части гена *Ppo4* был предсказан один интрон длиной 491 п.н., и два экзона длиной 807 п.н. и 879 п.н. (Рисунок 12), кодирующие пептид длиной 562 а.о. Из сравнения структурной организации генов семейства полифенолоксидазы ячменя видно, что гены *Ppo3* и *Ppo4* отличаются по своей экзон-интронной структуре от описанных ранее генов *Ppo1* и *Ppo2*, содержащих по три экзона и два интрона (Рисунок 12).

Несмотря на различия в структуре генов *Ppo*, а также их высокую вариабельность внутри семейства, все четыре гена обладают функциональным тирозиназным доменом, включающим два консервативных Си-связывающих мотива (Приложение б). Также при помощи моделирования структуры белка

в программе SWISS-MODEL было показано, что все четыре гена обладают сходной третичной структурой белка и неповрежденным активным центром (Приложение 7).

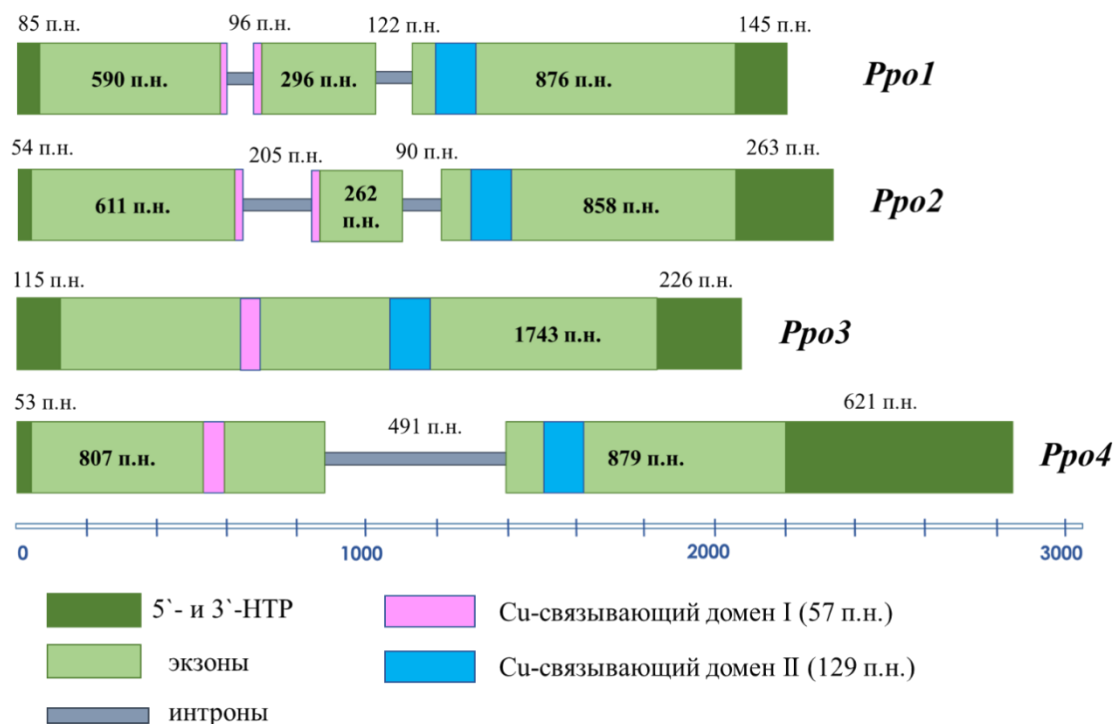


Рисунок 12. Сравнение структурной организации генов *Ppo* ячменя. Структура генов *Ppo1* и *Ppo2* была описана ранее (Taketa et al. 2010), а генов *Ppo3* и *Ppo4* – в данной работе. НТР – нетранслируемые районы.

3.4.2 Кластерный анализ генов *Ppo*

Используя аминокислотную последовательность тирозиназного домена генов *Ppo* ячменя (*Hordeum vulgare*), при помощи алгоритма BLAST были идентифицированы последовательности генов *Ppo* у других видов злаковых, включая представителей трибы Пшеницевые (*Triticeae*) – *Triticum aestivum*, *Triticum urartu*, *Aegilops tauschii*, *Hordeum chilense*; а также рис (*Oryza sativa*), кукуруза (*Zea mays*), брахиподиум (*Brachypodium distachyon*), сорго (*Sorghum bicolor*). В качестве аутгруппы была использована последовательность PPO гиней (*Dioscorea rotundata*). Филогенетическое дерево, построенное на основании этих последовательностей, представлено на Рисунке 13. Полный

список последовательностей генов с указанием идентификационных номеров из базы данных Ensemble Plants представлен в Приложении 8.

Согласно филогенетическому дереву, гены *Ppo* можно разделить на два больших кластера, в каждом из которых можно выделить по два подкластера. В первый кластер, обозначенный как PPO-1, вошли гены *Ppo1* и *Ppo2* ячменя (*Hordeum vulgare* и *Hordeum chilense*) и высокогомологичные к каждому из этих генов последовательности мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), эгилопс (*Aegilops tauschii*) и урарту (*Triticum urartu*), а также риса (*Oryza sativa*), кукурузы (*Zea mays*), брахиподиума (*Brachypodium distachyon*) и сорго (*Sorghum bicolor*). Внутри данного кластера последовательности PPO видов Triticeae разделяются на два подкластера – PPO-1.1 и PPO-1.2, которые представлены двумя группами дублицированных генов на хромосоме 2. Для кластеров PPO-1.1 и PPO-1.2 были идентифицированы по одному гену в геномах А, В и D мягкой пшеницы, а также *Aegilops tauschii* (D-геном). Для *Triticum urartu* (А-геном) была идентифицирована только последовательность гена из кластера PPO-1.1, но не из кластера PPO-1.2.

Во втором кластере, обозначенном как PPO-2, также можно выделить два подкластера PPO-2.3, сформированный генами PPO с третьей группы хромосом Triticeae, и PPO-2.4, сформированный генами PPO с четвертой группы хромосом. В кластере PPO-2.3, куда входит ген *Ppo3* ячменя были также идентифицированы последовательность *Triticum urartu*, А- и В-геномные последовательности *Triticum aestivum*. В кластере PPO-2.4, включающем ген *Ppo4* ячменя, были идентифицированы два гена на хромосоме 4D и один ген на хромосоме 4В *Triticum aestivum*, а также один ген *Aegilops tauschii*. Помимо представителей трибы Triticeae в кластер PPO-2 вошли по одному гену риса, кукурузы, брахиподиума и сорго.

Гены в кластерах PPO1 и PPO2 обладают различной экзон-интронной структурой. В группе PPO1 большинство генов имеют три экзона, за исключением генов PPO-A2 и PPO-D2 мягкой пшеницы, которые имеют два

экзона, а также гена PPO1 брахиподиума, у которого последовательность представлена одним экзоном. Для генов из группы PPO2 в целом характерно наличие двух экзонов, однако в подгруппе PPO-2.3 гены имеют только один экзон, за исключением гена PPO-3 *Triticum urartu*. В подгруппе PPO-2.4 ген PPO-4D2 *Triticum aestivum* имеет три экзона.

Таким образом, можно сделать вывод, что идентифицированные в ходе данной работы гены *Ppo3* и *Ppo4* не являются уникальными для ячменя, поскольку представлены ортологичными генами у других видов злаков, и, вероятно, возникли еще у общего предка злаковых растений.

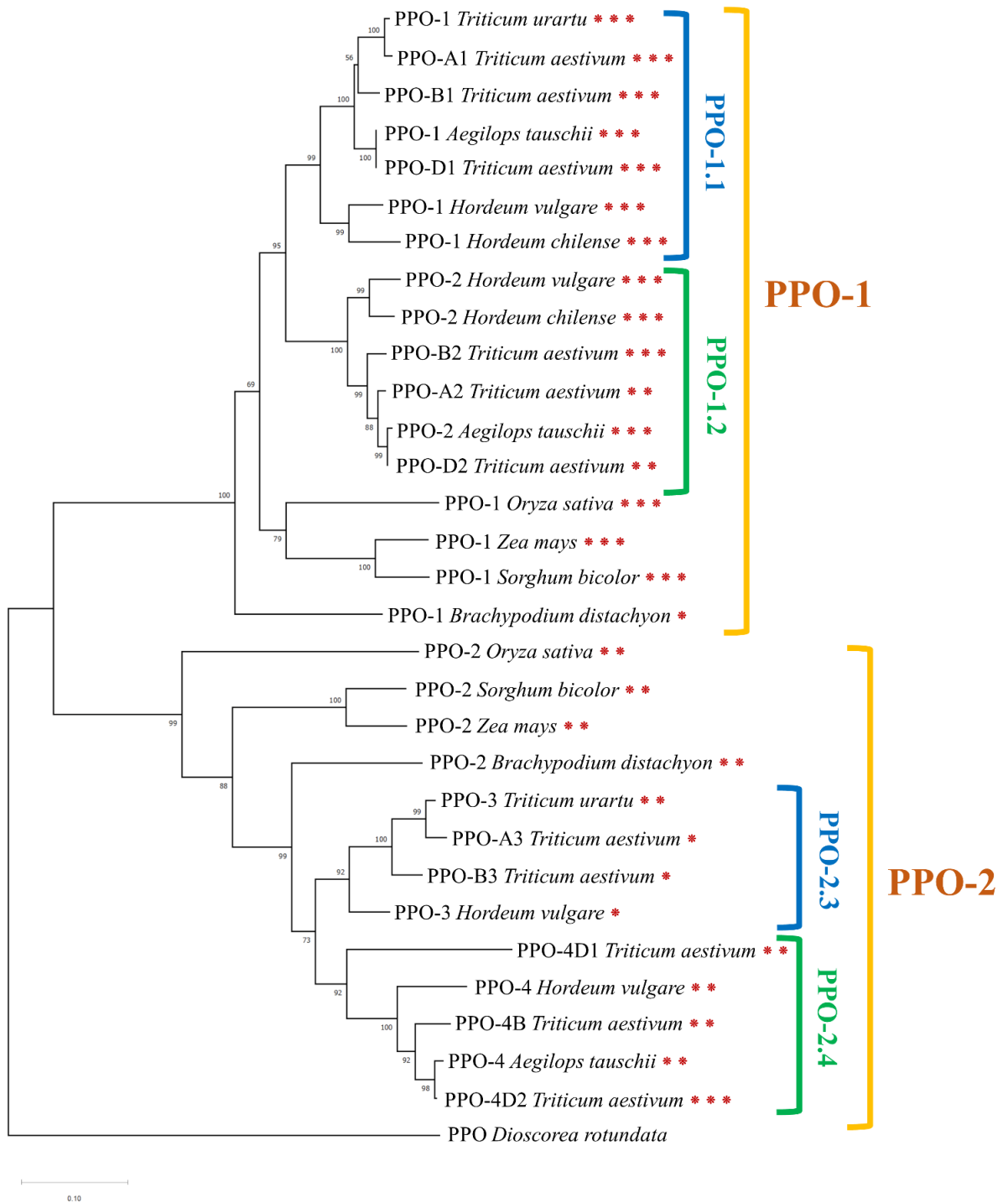


Рисунок 13. Филогенетическое дерево, построенное на основании аминокислотных последовательностей тирозиназного домена генов *Ppo* с использованием метода Neighbor joining с бутстреп поддержкой 1000. * - обозначает количество экзонов, предсказанных в нуклеотидной последовательности генов.

3.4.3 Сравнительный анализ экспрессии генов *Ppo* в колосе почти-изогенных линий ячменя

С целью проверки функциональной активности генов *Ppo* в колосе ячменя, а также выявления их связи с меланогенезом, был проведен сравнительный анализ экспрессии данных генов в линии *i:WwBlp1* и *Bowman* в динамике развития колоса. Для этого к каждому гену *Ppo* были подобраны специфичные праймеры. Результаты анализа представлены на Рисунке 14. Из рисунка видно, что все четыре гена *Ppo* являются транскрипционно активными в колосе ячменя, и в отличие от генов пути биосинтеза фенилпропанодов, активируются по мере его созревания. Ни один из генов *Ppo* не экспрессируется в развивающемся колосе вне зависимости от генотипа, однако на более поздних стадиях созревания колоса, можно выделить специализацию генов в зависимости от присутствия меланина. Транскрипционная активность генов *Ppo1* и *Ppo4* увеличивается по мере созревания колоса, однако значимо не отличается между линиями. Ген *Ppo2* не является транскрипционно активным в *Bowman* ни на одной из стадий развития колоса, при этом был показан высокий уровень экспрессии данного гена в линии с меланином в зерне – *i:WwBlp1*. Можно также выделить ген *Ppo3*, который обладает схожим паттерном экспрессии, как и ген *Ppo2*, однако уровень его экспрессии примерно на два порядка ниже, и различия в уровнях экспрессии между линиями не являются статистически достоверными. Таким образом, можно предположить, что один из четырех генов из семейства полифенолоксидаз ячменя, *Ppo2*, участвует в окислении фенольных субстратов в процессе синтеза меланина.

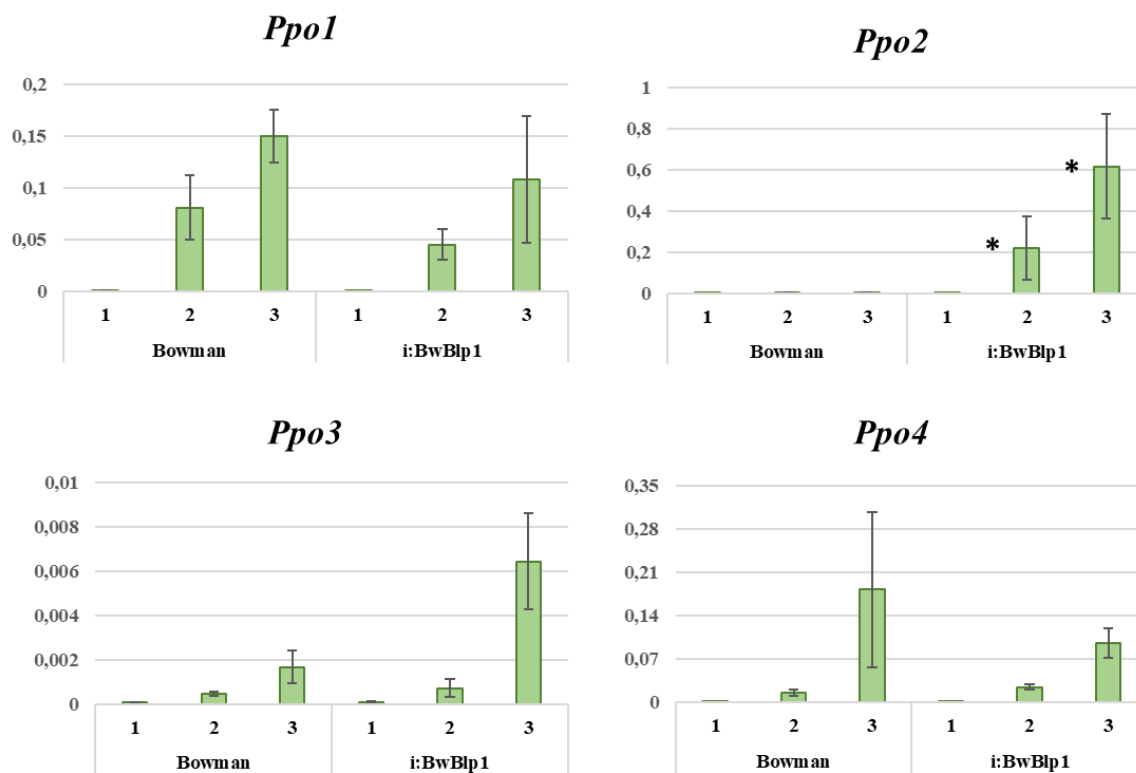


Рисунок 14. Относительный уровень экспрессии генов *Ppo1*, *Ppo2*, *Ppo3* и *Ppo4* в динамике созревания колоса ячменя. 1 – развивающийся колос на стадии выхода в трубку, 2 – стадия молочно-восковой спелости зерна, 3 – стадия ранней восковой спелости зерна. Планки погрешности отражают стандартное отклонение. * - отличия являются статистически значимыми (U-test, $p < 0,05$) между линией i:BwBlp1 и Bowman на соответствующей стадии развития.

3.4.4 Проверка участия гена *Ppo2* в синтезе меланина

Для проверки участия гена *Ppo2* в синтезе меланина в цветковых чешуях и перикарпе ячменя, было проанализировано расщепление в поколении F_2 скрещиваний двух линий с мутациями в генах *Ppo1* и *Ppo2* с линией *i:WwBlp1*, несущей доминантные гены *Ppo1*, *Ppo2* и *Blp1*. Линия U004 имеет мутацию в 481 позиции первого экзона гена *Ppo1*, приводящей к замене кодона, кодирующего глутамин на стоп-кодон, линия I667 имеет однонуклеотидную вставку во втором экзоне гена *Ppo1*, а также вставку 8 п.н. в первом экзоне гена *Ppo2*. Данные линии обладают фенол-негативным фенотипом (Taketa et al., 2010). При скрещивании данных линий с *i:WwBlp1* были получены две популяции F_2 : I677 x *i:WwBlp1* (202 растения), U004 x *i:WwBlp1* (124 растения). Оценка расщепления по окраске зерновки в данных скрещиваниях представлена в Таблице 5. В поколении F_1 для всех растений, полученных в результате скрещиваний, наблюдалась черная окраска цветковых чешуй и перикарпа как в *i:WwBlp1*. В поколении F_2 , полученном в результате скрещивания с линией U004, наблюдались два фенотипических класса, соответствующих фенотипам родительских форм (Рисунок 15), и расщепление по признаку черной окраски зерновки статистически достоверно соответствовало 3:1 ($\chi^2 = 1,548$, p-value = 0,213). При генотипировании данных растений ПЦР-маркерами к генам *Ppo1* и *Blp1* было показано, что присутствие меланина в зерновке зависит только от аллельного состояния гена *Blp1* и не зависит от аллелей гена *Ppo1* (Рисунок 15).

В поколении F_2 , полученном в результате скрещивания *i:WwBlp1* с линией I677, несущей рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2*, было выявлено три фенотипических класса: черная окраска зерновки, соответствующая фенотипу *i:WwBlp1* с темной окраской цветковых чешуй и перикарпа, и иногда остей; серая – с более светлой, серо-коричневой окраской зерновки и светлыми остями; белая – в зерновке нет меланина, имеет белый или голубой цвет,

соответствует фенотипу линии I677 (Рисунок 16). Черный, серый и белый фенотипические классы были представлены в соотношении 9:3:4 ($\chi^2 = 1,547$, $p\text{-value} = 0,461$). В результате генотипирования данных растений при помощи ПЦР-маркеров к генам *Blp1* и *Ppo2*, было установлено, что у 24 растений из 31, имеющих промежуточный фенотип (серый), было выявлено наличие рецессивного аллеля гена *Ppo2* и присутствие доминантного аллеля гена *Blp1* в гомозиготе или гетерозиготе (Рисунок 15). Причем, все растения с черным пигментом в зерновке имели доминантный аллель *Blp1*, и ни одно из растений, несущих доминантный аллель *Blp1* и рецессивный аллель *Ppo2* не характеризовались полным отсутствием меланина. Таким образом, можно предположить, что ген *Ppo2* действительно оказывает влияние на синтез меланина в зерновке ячменя, однако, его присутствие не является необходимым.

U004 x i:Vw <i>Blp1</i> 124 растения		I677 x i:Vw <i>Blp1</i> 200 растений	
<i>Blp1_ Ppo1_</i> 68 растений черные	<i>blp1blp1 Ppo1_</i> 26 растений белые	<i>Blp1_ Ppo2_</i> 118 растений 111 - черные 7 - серые	<i>blp1blp1 Ppo2_</i> 42 растения все белые
<i>Blp1_ ppo1ppo1</i> 21 растение черные	<i>blp1blp1 ppo1ppo1</i> 9 растений белые	<i>Blp1_ ppo2ppo2</i> 30 растений 6 - черные 24 - серые	<i>blp1blp1 ppo2ppo2</i> 10 растений все белые

Рисунок 15. Сопоставление результатов фенотипирования и генотипирования растений по генам *Ppo1*, *Ppo2*, *Blp1* в поколении F₂ скрещиваний U004 x i:Vw*Blp1* и I677 x i:Vw*Blp1*. Для двух растений из популяции I677 x i:Vw*Blp1* аллель гена *Ppo2* не был определен.

Таблица 5. Расщепление по окраске зерновки в поколении F₂ скрещиваний U004 x *i:BwBlp1* и I677 x *i:BwBlp1*.

Скрещивание	Ожидаемое		Наблюдаемое		χ ²	p-value		
	черный	белый	черный	белый				
U004 x <i>i:BwBlp1</i>	93	31	87	37	1,548	0,213374		
	Ожидаемое			Наблюдаемое			χ ²	p-value
	черный	серый	белый	черный	серый	белый		
I677 x <i>i:BwBlp1</i>	113,625	37,875	50,5	119	31	52	1,547	0,461452



Рисунок 16. (А) Колосья линий *i:BwBlp1*, U004 и I677, используемые для анализа. (Б) Колосья растений F₂ скрещивания I677 x *i:BwBlp1*, имеющих промежуточный фенотип (серый), отличный от окраски зерновки у родительских форм.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Выделение и анализ гена-кандидата на роль *Blp1*

4.1.1 Ассоциативное картирование гена в локусе *Blp1*

Черная окраска семян, обусловленная синтезом и накоплением меланина, является распространенным признаком у растений. Присутствие меланина в оболочках семян было подтверждено при помощи физико-химических методов для ряда растений, включая ячмень (Glagoleva et al., 2020). Несмотря на широкое распространение данного признака, его генетическая природа остается у растений практически неизученной. У ячменя, черная окраска зерновки находится под моногенным контролем локуса *Blp1*, локализованным на длинном плече хромосомы 1Н. Недавно данный локус был картирован в районе протяженностью 0,8 Мб, в котором был предсказан 21 ген (Long et al., 2019), однако конкретный ген, ответственный за накопление меланина у ячменя, так и не был выделен.

Основной задачей данного исследования было точное картирование и выделение гена-кандидата на роль *Blp1*. Для этого, был использован метод ассоциативного картирования с привлечением материала биоресурсных коллекций ячменя ВИР и ИЦиГ СО РАН. В итоге, были созданы две выборки: с меланином в зерне (207 образцов) и без меланина (186 образцов). Для генотипирования полученных выборок было выбрано 9 ПЦР-маркеров, которые целиком охватывают локус *Blp1*. В результате, для аллелей одного из маркеров к гену *HORVU1Hr1G086780* была показана наибольшая ассоциация с присутствием меланина (Таблица 3): аллель А был представлен в 96,61% образцов с неокрашенным колосом, а аллель В в 100% образцов с черной окраской. Таким образом, было выдвинуто предположение, что ген *HORVU1Hr1G086780* является геном-кандидатом на роль *Blp1*.

Ранее Long с коллегами (2019) было сделано предположение о том, что вероятным кандидатом на роль *Blp1* может быть другой ген из данного локуса

– *HORVU1Hr1G087010*, кодирующий фиолетовую кислую фосфатазу (purple acid phosphatase, PAP). Предположительно, активный фермент PAP способен генерировать активные формы кислорода, необходимые для процесса окисления фенольных кислот в процессе синтеза меланина. При сравнении нуклеотидной последовательности данного гена у линий ячменя с меланином и без, было выявлено 4 несинонимичных замены в кодирующей области гена и 12 замен в 5'-нетранслируемой области, что предположительно может оказывать влияние на его транскрипционную активность в образцах окрашенного и неокрашенного ячменя (Long et al., 2019). Однако, в настоящей работе, для маркеров к генам, расположенных рядом с PAP (*HORVU1Hr1G086930* и *HORVU1Hr1G087050*, Таблица 1) не было выявлено значимой ассоциации с присутствием меланина в зерновке (Таблица 3).

4.1.2 Анализ структуры и функции гена-кандидата на роль *Blp1*

Было предсказано, что выделенный ген-кандидат относится к семейству CLE-генов, которые участвуют в дифференцировке клеток меристем и органогенезе растений (Ni and Clark, 2006). Данный ген представляет собой трансмембранный пептид, состоящий из сигнального N-концевого пептида и CLAVATA3/CLE3-пептида, на С-конце которого выделяют высоко консервативный участок длиной 13 а.о. – CLE-домен (Рисунок 9). Сигнальный путь CLAVATA участвует в поддержании популяций стволовых клеток в меристемах корня и побега растений, и состоит из сигнального пептида CLV3 (CLE), рецептор-подобных киназ CLV1 и CRN, и рецептор-подобного белка CLV2 (Jeong et al., 1999; Müller et al., 2008). Считается, что белки CLV1, CLV2 и CRN узнают пептид CLV3, в результате чего происходит их активация, что в конечном итоге снижает экспрессию фактора транскрипции WUSCHEL (WUS), способствующего пролиферации стволовых клеток (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Было показано, что мутации в CLV1, CLV2, CLV3 или CRN приводят к увеличению экспрессии WUS и последующей экспансии

стволовых клеток в меристемах (Schoof et al., 2000). Также потеря функции гена *CLV3* приводит к дедифференцировке и усилению пролиферации ранее дифференцированных клеток (Reddy and Meyerowitz, 2005).

В данной работе был проведен сравнительный анализ экспрессии гена, кодирующего CLE-пептид в различных органах ячменя, а также в динамике созревания колоса (Рисунок 10). Наибольшая транскрипционная активность данного гена наблюдалась в корнях проростков, что хорошо согласуется с данными исследований об активности генов семейства *CLAVATA* в процессе дифференцировки клеток меристемы корня (Yamaguchi et al., 2016). При этом, наблюдаемый уровень экспрессии гена-кандидата в колосе был в целом на порядок ниже чем в корнях, однако выявленные различия были статистически достоверными между *i:VwBlp1* и *Bowman* на стадиях молочно-восковой и восковой спелости.

В последнее время в литературе появляются новые данные об участии сигнального пути *CLAVATA-WUSCHEL* в процессах формирования соцветий, формы и размера плодов, а также определения архитектуры колоса у злаков (Basu et al., 2019; Liu et al., 2020). У ячменя, было показано наличие дифференциальной экспрессии генов *CLV1*, *CLV2* и *WUS* на самых ранних стадиях развития и дифференцировке колоса (Liu et al., 2020). Однако для генов, кодирующих сигнальные пептиды *CLV3*, паттерны экспрессии выявлены не были, что, возможно, связано с их низкой транскрипционной активностью в колосе. Более того, в некоторых исследованиях были выдвинуты предположения о возможных плеiotропных функциях сигнальных пептидов CLE, включая влияние на метаболизм фенилпропаноидов. У арабидопсиса, при анализе мутантов по генам, кодирующим различные CLE-пептиды, был описан карликовый фенотип, у которого листья приобретали интенсивную антоциановую окраску, которая не наблюдалась у дикого типа (Strabala et al., 2006). В результате сравнительного транскриптономного анализа в соцветиях почти-изогенных линий томата, несущих мутации в генах *Clv3* и *Wus*, была выявлена повышенная экспрессия

генов, вовлеченных в метаболизм лигнина, биосинтез флавоноидов и ответ на стимулы окружающей среды (Chu et al., 2019). Тем не менее, предположение о возможной роли гена из семейства *CLAVATA* в синтезе меланина выдвинуто впервые в данной работе.

Нуклеотидная последовательность гена-кандидата была секвенирована и проанализирована в образцах ячменя с меланином и без, имеющих различное географическое происхождение, включая образцы дикого ячменя. В результате были выявлены девять полиморфизмов, которые наследуются совместно, формируя гаплотип, ассоциированный с наличием окраски. Семь из девяти полиморфизмов локализованы в 5'-нетранслируемом районе гена, а два расположены в белок-кодирующей области (Рисунок 9). Причем, обе замены в белок-кодирующей области являются несинонимичными и приводят к замене аминокислоты. Можно предположить, что разные фенотипические проявления гена-кандидата связаны либо с заменами в белок-кодирующей части гена, либо с полиморфизмами в 5'-нетранслируемой области, которые могут влиять на пространственную структуру мРНК и её эффективность связывания с рибосомой в процессе трансляции.

Было показано, что один из вариантов описанного гаплотипа, включающий девять совместно наследуемых полиморфизмов, встречается у всех проанализированных образцов ячменя с меланином, а второй вариант – был выявлен только среди образцов без меланина (Рисунок 9, Приложение 5). Это наблюдение позволяет предположить, что гаплотип, ассоциированный с черной окраской зерновки, имеет монофилетическое происхождение и вероятно возник еще до доместикации ячменя. Это согласуется с данными геногеографического анализа, проведенного на 178 образцах дикого и культурного ячменя, среди которых было 49 образцов с черной окраской зерновки, при помощи 13 ПЦР-маркеров, сцепленных с локусом *Blp1* (Long et al., 2019). Исследуемые образцы разделялись на три основных кластера: первые два кластера включали только образцы с неокрашенной зерновкой, внутри которых происходило разделение на кластеры меньшего порядка в

зависимости от географического происхождения образцов. Образцы, произрастающие в области Ближнего Востока (Сирия, Иран, Израиль) выделялись в отдельные небольшие кластеры, как и образцы из области Восточной Азии и Тибета. В третий крупный кластер попали все образцы с черной зерновкой, имеющие различное географическое происхождение, что, по мнению авторов, указывает на то, что признак черной окраски относительно консервативен и, вероятно, произошел от одного источника, существовавшего до разделения дикого ячменя на Ближнем Востоке и в Тибете (Long et al., 2019).

4.2 Идентификация других генов-участников меланогенеза у ячменя

4.2.1 Гены пути биосинтеза фенилпропаноидов

Ранее была предположена тесная связь пути биосинтеза фенилпропаноидов и меланогенеза у растений. Считается, что промежуточные соединения данного метаболического пути могут выступать в качестве фенольных субстратов в процессе синтеза меланина. Например, было установлено, что мономеры меланина овса преимущественно представлены п-кумаровой кислотой (Varga et al., 2016), которая является одним из ключевых соединений в процессе синтеза флавоноидов и монолигнолов (Рисунок 1). Также в сравнительных транскриптомных исследованиях была показана повышенная экспрессия генов данного метаболического пути в семенах, содержащих меланин, на поздних стадиях их созревания (Wan et al., 2016; Glagoleva et al., 2017; L. Wang et al., 2020).

В рамках данной работы был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов – *Pal*, *C4h* и *4Cl*, а также генов *Hct*, *C3'h* и *Comt*, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе монолигнолов, в почти-изогенных линиях ячменя в динамике развития колоса (Рисунок 11). Было показано, в развивающемся колосе на стадии выхода в трубку происходит

активация генов данного метаболического пути вне зависимости от генотипа растения. Однако, в линии, накапливающей меланин в оболочках зерна – i:WwB1p1, происходит вторичная активация генов *Pal*, *C4h*, *4Cl* и *C3`h* на ранней восковой стадии спелости, в то время как в неокрашенном сорте Bowman их экспрессия постепенно снижается по мере созревания колоса. Таким образом, в данной работе было продемонстрировано, что гены пути биосинтеза фенилпропаноидов вовлечены в меланогенез у ячменя, а также впервые показано наличие их вторичной активации в ответ на синтез меланина.

Более того, в данном исследовании была выявлена специфическая активация экспрессии гена, кодирующего *O*-метилтрансферазу кофейной кислоты (COMT) в линии с меланином в зерне на молочно-восковой и ранней восковой стадиях спелости (Рисунок 11). Данный фермент в процессе биосинтеза монолигнолов может осуществлять несколько реакций, в результате которых могут синтезироваться такие фенольные соединения как феруловая и синапиновая кислоты, кониферовый и синапиловый альдегиды, кониферовый и синапиловый спирты (Marchiosi et al., 2020). Среди перечисленных соединений феруловая кислота является наиболее вероятным мономером меланина у ячменя, поскольку было показано ее присутствие в высоких концентрациях в оболочках зерна у пшеницы и ячменя (Hernanz et al., 2001; Nemery et al., 2009; Barron et al., 2017). Также феруловая кислота считается наиболее предпочтительным субстратом для полифенолоксидазы (PPO) у пшеницы (Laddomada et al., 2016).

4.2.2 Гены семейства полифенолосидаз (*Ppo*) ячменя и их роль в синтезе меланина

4.2.2.1 Анализ семейства генов *Ppo*

Известно, что меланины являются результатом ферментативного окисления фенольных соединений до высокорепертивных хинонов

полифенолоксидазами (PPO) с их последующей полимеризацией, что происходит при механическом повреждении тканей растений (Nicolas et al., 1994). Однако, в последнее время появляются данные о возможных функциях PPO и в неповрежденных тканях растений (Воескх et al., 2015, 2017), также участие генов, кодирующих PPO, в формировании черной окраски семян было показано для риса (Fukuda et al., 2012), арахиса (Wan et al., 2016), арбуза (Li et al., 2020), кунжута (L. Wang et al., 2020).

У ячменя ранее было описано два гена, кодирующих полифенолоксидазу – *Ppo1* и *Ppo2*, локализованных на длинном плече хромосомы 2Н (Taketa et al., 2010). В данном исследовании, по гомологии с известными генами *Ppo* были идентифицированы еще два гена, которые локализованы на длинных плечах хромосом 3Н и 4Н. По аналогии с известными генами, выделенные гены были названы *Ppo3* и *Ppo4*, соответственно. При сравнении структурной организации генов *Ppo* было показано, что гены *Ppo3* и *Ppo4* отличаются по своей экзон-интронной структуре от ранее выделенных генов *Ppo1* и *Ppo2*, которые содержат по три экзона и два интрона. В то время как ген *Ppo4* включает только два экзона и один интрон, ген *Ppo3* не содержит интронов (Рисунок 12). Несмотря на высокую вариабельность последовательностей генов *Ppo* ячменя, все четыре гена сохраняют тирозиназный домен, последовательность которого является консервативной у растений, а также функциональный активный центр белка (Приложения 6 и 7). Высокая вариабельность структуры генов полифенолоксидаз часто наблюдается у растений, у которых PPO кодируется семействами генов, и связана с высокой специфичностью отдельных PPO к температуре, рН и фенольному субстрату (Yoruk and Marshall, 2003).

Были также идентифицированы последовательности генов, кодирующих PPO, у других видов злаков, включая мягкую пшеницу (*Triticum aestivum*), эгилопс (*Aegilops tauschii*) и урарту (*Triticum urartu*), а также риса (*Oryza sativa*), кукурузы (*Zea mays*), брахиподиума (*Brachypodium distachyon*) и сорго (*Sorghum bicolor*). На основании аминокислотной последовательности

тирозинового домена было сконструировано филогенетическое дерево, представленное на Рисунке 13. Гены *Ppo* данных видов растений разделились на два крупных кластера, внутри которых гены видов *Triticeae* разделяются на два кластера меньшего порядка. Известно, что размер семейств генов, кодирующих РРО, у разных видов растений может существенно варьировать (Jukanti, 2017; Tran et al., 2012). Такие различия в количестве генов *Ppo* достигаются как за счет приобретения новых генов в результате сегментных дупликаций, происходящих в геномах растений, так и из-за утраты ранее дублированных генов (Tran et al., 2012). Причем, считается, что паттерны приобретения/утраты генов *Ppo* отличаются для однодольных и двудольных видов растений. Для двудольных растений, у которых семейство РРО представлено большим количеством генов, характерно появление многочисленных дублированных генов, которые возникли уже после дивергенции видов. К примеру, семь из одиннадцати генов *Ppo* тополя (*Populus trichocarpa*) произошли в результате сегментных дупликаций и формируют один кластер на филогенетическом дереве, в то время как для остальных генов были выявлены ортологи среди других видов двудольных растений (Tran et al., 2012). В то же время у двудольных растений гены *Ppo* могут быть полностью утрачены, например, у *Arabidopsis thaliana*, либо могут присутствовать единичные гены *Ppo* (Taranto et al., 2017; Tran et al., 2012). Для однодольных растений, наоборот, считается, что сегментные дупликации генов *Ppo* произошли еще у общего предка однодольных растений до дивергенции видов. Предположительно общий предок однодольных имел четыре гена *Ppo* (Tran et al., 2012). Некоторые из этих предковых генов были утрачены в ходе эволюции, например, у риса, в геноме которого выделено только два гена *Ppo* (*Oryza sativa*) (Yu et al., 2008), либо приобретены дополнительные дублированные гены, например, у сорго было идентифицировано восемь генов *Ppo* (Cai et al., 2013). Было показано, в том числе в рамках данного исследования, что гены ячменя *Ppo1* и *Ppo2* являются ортологами одного из генов *Ppo* риса – *Phr1* (РРО-1 на Рисунке 13), и возникли

вследствие сегментной дупликации длинного плеча хромосомы 2 у общего предка трибы *Triticeae* (Taketa et al., 2010; Taranto et al., 2017). Данные гены вместе с генами-ортологами, идентифицированными у кукурузы, сорго и брахиподиума, образуют кластер PPO-1 (Рисунок 13). Другие два гена ячменя *Ppo3* и *Ppo4*, впервые выделенные и охарактеризованные в данной работе, вместе с ортологичными им генами, формируют другой кластер – PPO-2. Поскольку, в кластере PPO-2 представлены по одному гену *Ppo* кукурузы и сорго, а ортологи отдельно для генов *Ppo3* и *Ppo4* были выявлены только у мягкой пшеницы и еще близкородственных видов, то можно сделать вывод, что гены *Ppo3* и *Ppo4* возникли вследствие дупликации, произошедшей у предка *Triticeae*.

Ранее было показано, что гены *Ppo* однодольных растений формируют четыре кластера, включающие различные гены кукурузы и сорго (Tran et al., 2012). В данной работе, исследуемые гены *Ppo* ячменя формируют только два кластера, каждый из которых включает по гену *Ppo* риса, а также по одному гену кукурузы и сорго. На основании этого, можно предположить, что утрата двух генов *Ppo* произошла либо еще у общего предка *Oryza* и *Triticeae*, либо существуют еще не выделенные гены *Ppo* у ячменя и пшеницы, локализованные на других хромосомах.

4.2.2.2 Участие *Ppo* в синтезе меланина

В рамках данной работы был выполнен сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих PPO, в динамике развития колоса, с целью выявления взаимосвязи экспрессии отдельных генов *Ppo* с наличием меланиновой окраски (Рисунок 14). Было показано, что все гены являются функционально активными и имеют ненулевой уровень экспрессии как в неокрашенном, так и в окрашенном колосе ячменя. Тем не менее, взаимосвязь формирования меланиновой окраски с наличием значимо повышенного

уровня экспрессии в линии *i:WwBlp1* по сравнению с *Bowman* наблюдается только для гена *Ppo2*. В отличие от генов начальных этапов пути биосинтеза фенилпропаноидов, экспрессия генов *Ppo* отсутствует в развивающемся колосе и увеличивается по мере его созревания. Можно предположить, что на более ранних этапах развития колоса происходит синтез и накопление фенольных субстратов для РРО, которые окисляются на более поздних стадиях и полимеризуются с образованием меланина.

Для проверки предположения об участии гена *Ppo2* в синтезе меланина в зерновке ячменя, были проанализированы растения поколения F_2 , полученные в результате скрещивания линии U004, несущей рецессивный нефункциональный аллель гена *Ppo1*, и I677, несущей рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2*, с линией *i:WwBlp1*, имеющей доминантные гены *Ppo1* и *Ppo2* (Taketa et al., 2010). В результате скрещивания U004 x *i:WwBlp1* в поколении F_2 было выявлено два фенотипических класса, соответствующих окраске родительских форм, где черная окраска зерновки наследовалась согласно моногенному доминантному типу, многократно описанному для *Blp1* (Buckley, 1930; Woodward, 1941; Costa et al., 2001; Jia et al., 2017; Long et al., 2019). В результате генотипирования при помощи маркеров к генам *Ppo1* и *Blp1* было установлено, что все растения F_2 с черной окраской зерновки обладали доминантным аллелем *Blp1*, а также окраска растений не зависела от аллельного состояния гена *Ppo1*. Таким образом, данное наблюдение позволяет исключить участие гена *Ppo1* в синтезе меланина в зерновке ячменя.

Однако, при анализе расщепления, полученного в результате скрещивания I677 x *i:WwBlp1*, было идентифицировано три фенотипических класса, два из которых соответствовали фенотипам родительских форм – черная окраска зерновки и зерновка без черного пигмента, а третий являлся промежуточным и обладал светло-серой окраской зерновки (Рисунок 16). Наблюдаемые фенотипы наследовались согласно расщеплению 9:3:4 (черный, серый и белый, соответственно) (Таблица 5). Для 24 из 31 растений, обладающих серой окраской, было выявлено наличие рецессивного гена *Ppo2*.

Причем, все растения с черной и серой окраской зерновки имели доминантный аллель гена *Blp1*. Исходя из полученных результатов можно предположить наличие эпистатического взаимодействия между генами *Blp1* и *Ppo2*; для активации гена *Ppo2* необходимо присутствие *Blp1*, при этом, наличие доминантного гена *Ppo2* не является необходимым для синтеза меланина.

У риса (*Oryza sativa*), черная окраска семян определяется взаимодействием двух генов: *Phr1*, кодирующего полифенолоксидазу, и *Bh4*, кодирующего белок-транспортер тирозина (Zhu et al., 2011; Fukuda et al., 2012). Причем, для появления черного пимента необходимо присутствие функциональных аллелей обоих генов (Fukuda et al., 2012). Ген *Bh4* не является ортологом предложенного в данной работе гена-кандидата *Blp1*, а также локализация гена *Bh4* не является синтеничной локусу *Blp1*. Ген *Bh4* локализован на хромосоме 4 риса, которая является синтеничной 2 группе хромосом пшеницы, и, следовательно, ячменя (Kurata et al., 1994). Однако, как уже упоминалось ранее, ген *Phr1* является ортологом генов *Ppo1* и *Ppo2*. Присутствие функционального гена *Phr1* необходимо как для положительной фенольной реакции, так и для формирования черной окраски семян риса (Fukuda et al., 2012). У ячменя, ответственным за участие в фенольной реакции является ген *Ppo1* (Taketa et al., 2010), и как было показано в данной работе, данный ген не вовлечен в синтез меланина. С другой стороны, ген *Ppo2* не связан с появлением фенол-негативного фенотипа: среди 51 образцов ячменя с фенол-негативным фенотипом, выявленных в коллекции, включающей более девяти тысяч образцов, только три образца имели рецессивный ген *Ppo2*, причем, известно, что одним из этих образцов является линия I677, несущая рецессивные аллели и *Ppo2*, и *Ppo1* (Taketa et al., 2010). Однако, в данной работе было сделано предположение о том, что ген *Ppo2* является одним из участников меланогенеза. Вероятно, в процессе эволюции дублицированных генов *Ppo* у ячменя произошла их субфункционализация, в результате чего функции исходного гена-предшественника были разделены между двумя

дублированными генами (Lynch and Force, 2000; Moore and Purugganan, 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Меланины растений являются малоизученной группой пигментов фенольной природы, которые окрашивают оболочки семян растений в черный или коричневый цвет. Реакция, в результате которой происходит ферментативное окисление и полимеризация фенольных соединений с образованием меланина при механическом разрушении тканей растений, является хорошо известной. Однако, о природе генетически детерминированного синтеза меланина в неповрежденных оболочках семян растений к настоящему моменту известно сравнительно не много. Настоящая работа была посвящена идентификации и анализу генов, вовлеченных в меланогенез в зерновке ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Было проведено ассоциативное картирование гена, ответственного за накопление меланина в зерновке ячменя, в локусе *Blp1* и предложен вероятный ген-кандидат. Выявленный ген-кандидат кодирует сигнальный CLE-пептид из семейства генов CLAVATA, участвующий в дифференцировке клеток меристем. Ранее были выдвинуты предположения о возможном влиянии генов семейства CLAVATA на фенольный метаболизм растений, однако, связь генов данного семейства с синтезом меланина предложена впервые в данной работе. Для образцов ячменя, накапливающих меланин в оболочках зерновки, был описан гаплотип, включающий девять совместно наследуемых полиморфизмов. Наличие данного гаплотипа как у образцов ячменя различного географического происхождения, так и у образцов дикого ячменя, позволяет сделать вывод о его монофилетическом происхождении.

Был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих основные ферменты биосинтеза фенилпропаноидов, в колосе почти-изогенных линий ячменя. Показано, что активация экспрессии генов *Pal*, *C4h*, *4Cl*, участвующих в ключевых реакциях данного метаболического пути, происходит в линиях на ранних этапах созревания колоса вне зависимости от

типа накапливаемых пигментов. Более того, выявлено наличие вторичной активации данных генов, а также специфическая активация экспрессии гена *Comt* на поздних стадиях созревания зерновки в ответ на синтез меланина.

В результате анализа семейства генов полифенолоксидаз (PPO) ячменя были впервые выделены и охарактеризованы два новых гена данного семейства – *Ppo3* и *Ppo4*. Наряду с ранее описанными генами *Ppo1* и *Ppo2*, показано, что они обладают функциональным тирозиназным доменом и транскрипционно активны в зерновке ячменя. Было продемонстрировано, что экспрессия одного из генов данного семейства – *Ppo2* специфически активируется в линии, накапливающей меланин. При помощи анализа растений поколения F₂, полученных в результате скрещиваний линий, несущих рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2*, с линией *i:VwVlp1* было установлено наличие эпистатического взаимодействия между генами *Vlp1* и *Ppo2*.

В результате настоящего исследования были получены новые знания о возможных механизмах меланогенеза у ячменя, в том числе, выделены и проанализированы гены, которые вовлечены в биосинтез меланина. Полученные результаты станут основой для дальнейшего изучения механизмов синтеза меланина у растений. Разработанные ПЦР-маркеры к гену *Vlp1* могут быть использованы для эффективного маркер-контролируемого отбора генотипов ячменя с меланином в зерне. Помимо этого, результаты генотипирования и фенотипирования коллекций ячменя ВИР и ИЦиГ СО РАН пополнят информационные базы данных генетических коллекций новыми характеристиками, что важно для увеличения генетического разнообразия и дальнейшего использования материала биоресурсных коллекций.

ВЫВОДЫ

1. С помощью ассоциативного картирования *HORVU1Hr1G086780* определен как наиболее вероятный ген-кандидат на роль гена *Vlp1*, контролирующего признак черной окраски колоса ячменя. Показано, что *HORVU1Hr1G086780* кодирует сигнальный пептид с CLE-доменом;
2. Обнаружено, что наличие меланина в колосе ячменя видов *H. vulgare* и *H. spontaneum* ассоциировано с определенным гаплотипом гена *HORVU1Hr1G086780*, включающим девять совместно наследуемых полиморфизмов, среди которых два локализованы в белок-кодирующей области гена и семь в 5'-нетранслируемом районе; выявленный гаплотип, предположительно, имеет монофилетическое происхождение;
3. Показана вторичная активация ключевых генов биосинтеза фенилпропаноидов *Pal*, *C4h* и *4Cl*, а также специфическая активация экспрессии гена *Comt* на поздних стадиях созревания колоса при наличии доминантного аллеля *Vlp1*;
4. Выделены и охарактеризованы два новых гена семейства полифенолоксидаз ячменя – *Ppo3* и *Ppo4*, а также показано участие гена *Ppo2* в синтезе меланина в зерновке ячменя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aastrup S., Outtrup H., Erdal K. Location of the proanthocyanidins in the barley grain // Carlsberg Research Communications. – 1984. – Vol. 1. – I. 49. – P. 105–109.
2. Altunkaya A., Gökmen V. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from durum wheat (*Triticum durum* L.) // Journal of Cereal Science. – 2012. – Vol. 55. – I. 3. – P. 300–304.
3. Araji S., Grammer T. A., Gertzen R., Anderson S. D., Mikulic-Petkovsek M., Veberic R., Phu M. L., Solar A., Leslie C. A., Dandekar A. M., Escobar M.A. Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut // Plant Physiology. – 2014. – Vol. 3. – I. 164. – P. 1191–1203.
4. Barrett J., Fry B., Maller J., Daly M. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps // Bioinformatics (Oxford, England). – 2005. – Vol. 2. – I. 21. – P. 263–265.
5. Barron C., Holopainen-Mantila U., Sahlstrom S., Hotekjolen A. K., Lullien-Pellerin V. Assessment of biochemical markers identified in wheat for monitoring barley grain tissue // Journal of Cereal Science. – 2017. – I. 74. – P. 11–18.
6. Barros J., Escamilla-Trevino L., Song L., Rao X., Serrani-Yarce J. C., Palacios M. D., Engle N., Choudhury F. K., Tschaplinski T. J., Venables B.J., Mittler R., Dixon R. A. 4-Coumarate 3-hydroxylase in the lignin biosynthesis

- pathway is a cytosolic ascorbate peroxidase // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 1. – I. 10. – P. 1–11.
7. Basu U., Narnoliya L., Srivastava R., Sharma A., Bajaj D., Daware A., Thakro V., Malik N., Upadhyaya H. D., Tripathi S., Hegde V. S., Tyagi A. K., Parida S. K. CLAVATA signaling pathway genes modulating flowering time and flower number in chickpea // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2019. – Vol. 7. – I. 132. – P. 2017–2038.
 8. Bell A. A., Wheeler M. H. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins // *Annual Review of Phytopathology*. – 1986. – Vol. 1. – I. 24. – P. 411–451.
 9. Bernier A. M., Howes N. K. Quantification of variation in tyrosinase activity among durum and common wheat cultivars // *Journal of Cereal Science (United Kingdom)*. – 1994. – Vol. 19. – I. 2. – P.157-159.
 10. Bhowal J. G., Banerjee S. K., Joshi M. G. The Evolution of the Phenol Colour Reaction Gene in Wheat // *The Japanese Journal of Genetics*. – 1969. – Vol. 3. – I. 44. – P. 123–128.
 11. Boeckx T., Winters A. L., Webb K. J., Kingston-Smith A. H. Polyphenol oxidase in leaves: Is there any significance to the chloroplastic localization? // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 12. – I. 66. – P. 3571–3579.
 12. Boeckx T., Winters A., Webb K. J., Kingston-Smith A. H. Detection of potential chloroplastic substrates for polyphenol oxidase suggests a role in undamaged leaves // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 237.

13. Brand U., Fletcher J., Hobe M., Meyerowitz E., Simon R. (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity // *Science (New York, N.Y.)*. – 2000. – Vol. 289. – I. 5479. – P. 617–619.
14. Britton G. *The Biochemistry of Natural Pigments* / Cambridge University Press. – Cambridge, 1983. – 366 p.
15. Brunetti C., Ferdinando M. D., Fini A., Pollastri S., Tattini M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14. – I. 2. – P. 3540-3555.
16. Buckley G. F. H. (1930). Inheritance in Barley With Special Reference to the Color of Caryopsis and Lemma // *Scientific Agriculture*. – 1930. – Vol. 10. – I. 7. – P. 460–492.
17. Bungartz A., Klaus M., Mathew B., Léon J., Naz A. A. (2016). Development of new SNP derived cleaved amplified polymorphic sequence marker set and its successful utilization in the genetic analysis of seed color variation in barley // *Genomics*. – 2016. – Vol. 107. – I. 2–3. – P. 100–107.
18. Cai Y., Dong Z., Zhao S., Han Y., Shao Y., Lu M., Qin H., Liu X., Wang D., Chen Y. (2013). Genome-Wide Analysis of Polyphenol Oxidase Genes and Their Transcriptional Patterns during Grain Development in Sorghum // *International Journal of Plant Sciences*. – 2013. – Vol. 174. – I. 4. – P. 710–721.

19. Ceccarelli S., Grando S., Van Leur J. A. G. Genetic diversity in barley landraces from Syria and Jordan // *Euphytica*. – 1987. – Vol. 36. – I. 2. – P. 389–405.
20. 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 // *The Plant Cell*. – 1989. – Vol. 1. I. 12. – P. 1175–1183.
21. Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. Metabolism and roles of stilbenes in plants // *Plant Science*. – 2009. – Vol. 177. – I. 3. – P. 143–155.
22. Choo T. M., Vigier B., Savard M. E., Blackwell B., Martin R., Wang J., Yang J., Abdel-Aal E.-S. M. (2015). Black Barley as a Means of Mitigating Deoxynivalenol Contamination // *Crop Science*. – 2015. – Vol. 55. – I. 3. – P. 1096.
23. Chu Y. H., Jang J. C., Huang Z., van der Knaap E. Tomato locule number and fruit size controlled by natural alleles of *lc* and *fas* // *Plant Direct*. – 2019. – Vol. 3. – I. 7. – P. 1–20.
24. 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., Wang, M. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – I. 50. – P. 21611–21616.

- 25.Cordero R. J., Casadevall A. Functions of fungal melanin beyond virulence // *Fungal Biology Reviews*. – 2017. – Vol. 31. – I. 2. – P. 99.
- 26.Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16. – I. 22. – P. 10881–10890.
- 27.Costa J. M., Corey A., Hayes P. M., Jobet C., Kleinhofs A., Kopisch-Obusch A., Kramer S. F., Kudrna D., Li M., Riera-Lizarazu O., Sato K., Szucs P., Toojinda T., Vales M. I., Wolfe R. I. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: A phenotypically polymorphic doubled-haploid population // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – Vol. 103. – I. 2–3. – P. 415–424.
- 28.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 and Development*. – 1997. – Vol. 11. – I. 11. – P. 1422–1434.
- 29.Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K. M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 122. – I. 2. – P. 403–414.
- 30.Deng Y., Lu S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2017. – Vol. 36. – I. 4. – P. 257–290.
- 31.Di Mauro E., Xu R., Soliveri G., Santato C. Natural melanin pigments and their interfaces with metal ions and oxides: Emerging concepts and technologies // *MRS Communications*. – 2017. – Vol. 7. – I. 2. – P. 141–151.
- 32.D’Ischia M. Melanin-based functional materials // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – I. 1. – P. 228.

33. Downie A. B., Zhang D., Dirk L. M. A., Thacker R. R., Pfeiffer J. A., Drake J. L., Levy A. A., Butterfield D. A., Buxton J. W., Snyder J. C. Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 133. – I. 1. – P. 145–160.
34. Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U., Bonar N., Alexander J., Houston K., Radovic S., Shahinnia F., Vendramin V., Morgante M., Stein N., Waugh R. Genetic dissection of barley morphology and development // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 155. – I. 2. – P. 617–627.
35. Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis // *Trends in Plant Science*. – 2010. – Vol. 15. – I. 10. – P. 573–581.
36. Dubrovina A. S., Kiselev K. V. Regulation of stilbene biosynthesis in plants // *Planta*. – 2017. – Vol. 246. – I. 4. – P. 597–623.
37. Ferdinando M. Di, Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses / Springer. – N.Y., 2012. – P. 159–179.
38. Finch R. A., Simpson E. New colours and complementary colour genes in barley // *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung*. – 1978. – Vol. 81. – I. 1. – P. 40–53.
39. Fox D. L., Kuchnow K. P. Reversible, light-screening pigment of elasmobranch eyes: Chemical identity with melanin // *Science (New York, N.Y.)*. – 1965. – Vol. 150. – I. 3696. – P. 612–614.

40. Fukuda A., Shimizu H., Shiratsuchi H., Yamaguchi H., Ohdaira Y., Mochida H. Complementary genes that cause black ripening hulls in F₁ plants of crosses between indica and japonica rice cultivars // *Plant Production Science*. – 2012. – Vol. 15. – I. 4. – P. 270–273.
41. Gangopadhyay N., Hossain M. B., Rai D. K., Brunton N. P. A Review of Extraction and Analysis of Bioactives in Oat and Barley and Scope for Use of Novel Food Processing Technologies // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2015. – Vol. 20. – I. 6. – P. 10884–10909.
42. Ge X., Jing L., Zhao K., Su C., Zhang B., Zhang Q., Han L., Yu X., Li W. The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 335. – P. 127655.
43. Glagoleva A., Kukoeva T., Mursalimov S., Khlestkina E., Shoeva O. Effects of Combining the Genes Controlling Anthocyanin and Melanin Synthesis in the Barley Grain on Pigment Accumulation and Plant Development // *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12. – I. 1. – P. 112.
44. Glagoleva A. Y., Shmakov N. A., Shoeva O. Y., Vasiliev G. V., Shatskaya N. V., Börner A., Afonnikov D. A., Khlestkina E. K. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the Black lemma and pericarp (Blp) gene // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17(S1). – P. 182.
45. Glagoleva A. Y., Shoeva O. Y., Khlestkina E. K. Comparative characteristic of near-isogenic lines differing by the Blp locus in respect to abiotic stress

- resistance // *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology*. – 2019. – P. 89–91.
46. Glagoleva A. Y., Shoeva O. Y., Khlestkina E. K. Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11.
47. 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 regulatory genes into maize tissues // *The EMBO Journal*. – 1990. – Vol. 9. – I. 8. – P. 2517–2522.
48. Gordeeva E. I., Glagoleva A. Y., Kukoeva T. V., Khlestkina E. K., Shoeva O. Y. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): Marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network // *BMC Plant Biology*. – 2019. – Vol. 19(Suppl 1).
49. Gracheva N. V., Zheltobryukhov V. F. A method for obtaining melanins from sunflower husk and studying its antioxidant activity // *News of Kazan Technological University*. – 2016. – Vol. 19. – I. 15. – P. 154–157.
50. Grotewold E. *The Science of Flavonoids*. / Springer. – N.Y., 2006. – 273 p.
51. Gu X.-Y., Foley M. E., Horvath D. P., Anderson J. V., Feng J., Zhang L., Mowry C. R., Ye H., Suttle J. C., Kadowaki K., Chen Z. Association Between Seed Dormancy and Pericarp Color Is Controlled by a Pleiotropic Gene That Regulates Abscisic Acid and Flavonoid Synthesis in Weedy Red Rice // *Genetics*. – 2011. – Vol. 189. – I. 4. – P. 1515–1524.

52. Hamberger B., Ellis M., Friedmann M., de Azevedo Souza C., Barbazuk B., Douglas C. J. Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: The *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families // *Canadian Journal of Botany*. – 2007. – Vol. 85. – I. 12. – P. 1182–1201.
53. Harlan H. V. Some Distinctions in Our Cultivated Barleys With Reference To Their Use in Plant Breeding / *Bulletin of the U.S. Department of Agriculture*. – 1914.
54. Harris N. N., Javellana J., Davies K. M., Lewis D. H., Jameson P. E., Derolles S. C., Calcott K. E., Gould K. S., Schwinn K. E. Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA // *BMC Plant Biology*. – 2012. – Vol. 12. – I. 1. – P. 34.
55. Hemery Y., Lullien-Pellerin V., Rouau X., Abecassis J., Samson M. F., Aman P., von Reding W., Spoerndli C., Barron C. Biochemical markers: Efficient tools for the assessment of wheat grain tissue proportions in milling fractions // *Journal of Cereal Science*. – 2009. – Vol. 49. – I. 1. – P. 55–64.
56. Hernanz D., Nuñez V., Sancho A., Faulds C., Williamson G., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49. – I. 10. – P. 4884–4888.

- 57.Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 62. – I. 8. – P. 2465–2483.
- 58.Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley Ant1 and wheat Rc genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2015. – Vol. 290. – I. 4. – P. 1287–1298.
- 59.Himi E., Yamashita Y., Haruyama N., Yanagisawa T., Maekawa M., Taketa, S. Ant28 gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3 MYB domain protein (Hvmyb10) highly affects grain dormancy in barley // *Euphytica*. – Vol. 188. – I. 1. – P. 141–151.
- 60.Hori K., Kobayashi T., Sato K., Takeda K. QTL analysis of Fusarium head blight resistance using a high-density linkage map in barley // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – Vol. 111. – I. 8. – P. 1661–1672.
- 61.Interesse F. S., Ruggiero P., D'Avella G., Lamparelli F. Partial purification and some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1980. – Vol. 31. – I. 5. – P. 459–466.
- 62.Jana B. K., Mukherjee S. K. Notes on the Distribution of Phytomelanin Layer in Higher Plants – a Short Communication // *Journal of Pharmaceutical Biology*. – 2014. – Vol. 4. – I. 3. – P. 131–132.
- 63.Jende-Strid B. Genetic Control of Flavonoid Biosynthesis in Barley // *Hereditas*. – 2004. – Vol. 119. – I. 2. – P. 187–204.

64. Jensen M. K., Kjaersgaard T., Nielsen M. M., Galberg P., Petersen K., O'Shea C., Skriver K. The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling // *The Biochemical Journal*. – 2010. – Vol. 426. – I. 2. – P. 183–196.
65. Jeong S., Trotochaud A. E., Clark S. E. The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase // *The Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – I. 10. – P. 1925–1933.
66. Jia Q., Wang J., Zhu J., Hua W., Shang Y., Yang J., Liang Z. Toward Identification of Black Lemma and Pericarp Gene Blp1 in Barley Combining Bulk Segregant Analysis and Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1–11.
67. Jimenez M., Dubcovsky J. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat // *Plant Breeding*. – 1999. – Vol. 118. – I. 5. – P. 395–398.
68. Jukanti A. Polyphenol oxidases (PPOs) in plants / Springer Nature. – Singapore, 2017. – 131 p.
69. Jukanti A. K., Bruckner P. L., Fischer A. M. Evaluation of Wheat Polyphenol Oxidase Genes // *Cereal Chemistry*. – 2004. – Vol. 81. – I. 4. – P. 481–485.
70. Jukanti A. K., Bruckner P. L., Fischer A. M. Molecular and biochemical characterisation of polyphenol oxidases in developing kernels and senescing

- leaves of wheat (*Triticum aestivum*) // *Functional Plant Biology*. – 2006. – Vol. 33. – I. 7. – P. 685–696.
71. Kannan P., Ganjewala D. Preliminary Characterization of Melanin Isolated from Fruits and Seeds of *Nyctanthes arbor-tristis* // *Journal of Scientific Research*. – 2009. – Vol. 1. – I. 3. – P. 655–661.
72. Kao Y.Y., Harding S. A., Tsai C.J. Differential Expression of Two Distinct Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes in Condensed Tannin-Accumulating and Lignifying Cells of Quaking Aspen // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 130. – I. 2. – P. 796–807.
73. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – I. 6. – P. 1547–1549.
74. Kurata N., Moore G., Nagamura Y., Foote T., Yano M., Minobe Y., Gale M. Conservation of Genome Structure Between Rice and Wheat // *Bio/Technology*. – 1994. – Vol. 12. – I. 3. – P. 276–278.
75. Laddomada B., Durante M., Mangini G., D'Amico L., Lenucci M. S., Simeone R., Piarulli L., Mita G., Blanco A. Genetic variation for phenolic acids concentration and composition in a tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) collection // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2016. – Vol. 64. – I. 3. – P. 587–597.
76. Lahaye T., Hartmann S., Tosch S, Freialdenhoven A., Yano M., Schulze-Lefert P., Salamini F., Tosch S. High-resolution genetic and physical mapping

- of the Rar1 locus in barley // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – Vol. 97. – P. 526–534.
- 77.Landi M., Tattini M., Gould K. S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions // *Environmental and Experimental Botany*. – 2015. Vol. 119. – P. 4–17.
- 78.Li B., Lu X., Gebremeskel H., Zhao S., He N., Yuan P., Gong C., Mohammed U., Liu W. Genetic Mapping and Discovery of the Candidate Gene for Black Seed Coat Color in Watermelon (*Citrullus lanatus*) // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–10.
- 79.Liu H., Li G., Yang X., Kuijer H. N. J., Liang W., Zhang D. Transcriptome profiling reveals phase-specific gene expression in the developing barley inflorescence // *Crop Journal*. – 2020. – Vol. 8. – I. 1. – P. 71–86.
- 80.Llorente B., Alonso G., Bravo-Almonacid F., Rodríguez V., López M., Carrari F., Torres H., Flawiá M. Safety assessment of nonbrowning potatoes: Opening the discussion about the relevance of substantial equivalence on next generation biotech crops // *Plant Biotechnology Journal*. – 2011. – Vol. 9. – I. 2. – P. 136–150.
- 81.Llorente B., López M. G., Carrari F., Asís R., Di Paola Naranjo R. D., Flawiá M. M., Alonso G. D., Bravo-Almonacid F. Downregulation of polyphenol oxidase in potato tubers redirects phenylpropanoid metabolism enhancing chlorogenate content and late blight resistance // *Molecular Breeding*. – 2014. – Vol. 34. – I. 4. – P. 2049–2063.

82. Long Z., Jia Y., Tan C., Zhang X.-Q., Angessa T., Broughton S., Westcott S., Dai F., Zhang G., Sun D., Xu Y., Li C. Genetic Mapping and Evolutionary Analyses of the Black Grain Trait in Barley // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 9.
83. Lopusiewicz L. Antioxidant, antibacterial properties and the light barrier assessment of raw and purified melanins isolated from *Citrullus lanatus* (watermelon) seeds // *Herba Polonica*. – 2018. – Vol. 64. – I. 2. – P. 25–36.
84. Loskutov I. G., Blinova E. V., Gavrilova O. P., Gagkaeva T. Yu. The valuable characteristics of oats genotypes and resistance to *Fusarium* disease // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2016. – Vol. 20. – I. 3. – P. 286–294.
85. Lundqvist U., Franckowiak J. D., Konishi T. New and revised descriptions of barley genes // *Barley Genetics Newsletter*. – 1997.
86. Lyakh S. P. Microbial melanogenesis and its functions / *Nauka (Science)*. – 1981. – P. 22–270.
87. Lynch M., Force A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. – 2000. – Vol. 154. – I. 1. P. 459–473.
88. Madeira F., Park Y. M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A. R. N., Potter S. C., Finn R. D., Lopez R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – I. (W1). – P. W636–W641.
89. Marchiosi R., dos Santos W. D., Constantin R. P., de Lima R. B., Soares A. R., Finger-Teixeira A., Mota T. R., de Oliveira D. M., Foletto-Felipe M. de P., Abrahão J., Ferrarese-Filho O. Biosynthesis and metabolic actions of

- simple phenolic acids in plants // *Phytochemistry Reviews*. – 2020. – Vol. 19. – I. 4. – P. 865–906.
90. Marusek C., Trobaugh N., Flurkey W., Inlow J. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2006. – Vol. 100. – I. 1. – P. 108–123.
91. Mason H. S., Peterson E. W. Melanoproteins I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1965. – Vol. 111. – I. 1. – P. 134–146.
92. Matthews D. E., Carollo V. L., Lazo G. R., Anderson O. D. GrainGenes, the genome database for small-grain crops // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – I. 1. – P. 183–186.
93. Mavi K. (2010). The relationship between seed coat color and seed quality in watermelon Crimson sweet // *Horticultural Science*. – 2010. – Vol. 37. – I. 2. – P. 62–69.
94. Mboniyirivuze A., Mwakikunga B., Dhlamini S. M., Maaza M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Sepia Melanin // *Physics and Materials Chemistry*. – 2015. – Vol. 3. – I. 2. – P. 25-29.
95. Mitchell A. L., Attwood T. K., Babbitt P. C., Blum M., Bork P., Bridge A., Brown S. D., Chang H.Y., El-Gebali S., Fraser M. I., Gough J., Haft D. R., Huang H., Letunic I., Lopez R., Luciani A., Madeira F., Marchler-Bauer A., Finn R. D. InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – I. D1. – P. D351–D360.

96. Moore R. C., Purugganan M. D. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – Vol. 8. – I. 2. – P. 122–128.
97. Morishima H., Oka H.I. The Pattern of Interspecific Variation in the Genus *Oryza*: Its Quantitative Representation by Statistical Methods // *Evolution*. – 1960. – Vol. 14. – I. 2. – P. 153–165.
98. Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. The Receptor Kinase CORYNE of *Arabidopsis* Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1 // *The Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – I. 4. – P. 934–946.
99. Mursalimov, S., Glagoleva, A., Khlestkina, E., and Shoeva, O. Chlorophyll deficiency delays but does not prevent melanogenesis in barley seed melanoplasts // *Protoplasma*. – 2022. – I. 259. – P. 317–326.
100. Murukan N., Jha S., Mallick N., Verma A., Singh B., Ahlawat A., Tomar S. Distribution of genes producing phenol colour reaction in grains of wheat and its related species, mode of inheritance and breeding for low polyphenol activity // *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. – 2018. – Vol. 78. – P. 433–442.
101. Nakano Y., Yamaguchi M., Endo H., Rejab N. A., Ohtani M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6.
102. Newton A. C., Flavell A. J., George T. S., Leat P., Mullholland B., Ramsay L., Revoredo-Giha C., Russell J., Steffenson B. J., Swanston J. S.,

- Thomas W. T. B., Waugh R., White P. J., Bingham I. J. Crops that feed the world 4. Barley: A resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security // *Food Security*. – 2011. – Vol. 3. – I. 2. – P. 141–178.
103. Ni J., Clark, S. E. Evidence for Functional Conservation , Sufficiency , and Proteolytic Processing of the CLAVATA3 // *Plant Physiology*. – Vol. 140. – I. 2. – P. 726–733.
104. Nicolas, J. J., Richard- Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M., and Aubert, S. Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1994. – Vol. 34. I. 2. – P. 109–157.
105. Nicolaus R. A., Piattelli M., Fattorusso E. The structure of melanins and melanogenesis—IV // *Tetrahedron*. – 1964. – Vol. 20. – I. 5. – P. 1163–1172.
106. Olsen A. N., Ernst H. A., Leggio L. L., Skriver K. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse // *Trends in Plant Science*. – 2005. – Vol. 10. – I. 2. – P. 79–87.
107. Pandey A. K., Dhakal M. R. Phytomelanin in compositae // *Current Science*. – 2001. – Vol. 80. – I. 8. – P. 933–940.
108. Pandey A. K., Wilcox L. W., Sack F. D. Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (Compositae) // *American Journal of Botany*. – 1989. – Vol. 76. – I. 5. – P. 739–746.
109. Panzella L., Eidenberger T., Napolitano A., D'Ischia M. Black sesame pigment: DPPH assay-guided purification, antioxidant/ antinitrosating

- properties, and identification of a degradative structural marker // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – I. 36. – P. 8895–8901.
110. Park K. I. A bHLH protein partially controls proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in the seed coats of morning glory *Ipomoea tricolor* // *Horticulture Environment and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 53. – I. 4. – P. 304–309.
111. Parra-Vega V., Corral-Martínez P., Rivas-Sendra A., Seguí-Simarro J. M. Formation and excretion of autophagic plastids (plastolysomes) in *Brassica napus* embryogenic microspores // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6.
112. 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 // *The EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – I. 12. – P. 3553–3558.
113. Pérez-Gilabert M., García Carmona F. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – I. 3. – P. 695–700.
114. Petroni K., Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs // *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*. – 2011. – Vol. 181. – I. 3. – P. 219–229.
115. Plaschke J., Ganai M. W., Roder M. S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1995. – Vol. 91. – I. 6–7. – P. 1001–1007.

116. Pralea I. E., Moldovan R. C., Petrache A. M., Ilieș M., Hegheș S. C., Ielciu I., Nicoară R., Moldovan M., Ene M., Radu M., Uifălean A., Iuga C. A. From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – I. 16. – P. 3943.
117. Prota G. *Melanins and Melanogenesis* / Elsevier Science. – 1992. – 290 p.
118. Reddy G., Meyerowitz E. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the Arabidopsis shoot apex // *Science*. – 2005. – Vol. 310. – I. 5748. – P. 663–667.
119. Roberson D. W., Deming G. W. Genetics studies in barley // *Journal of Heredity*. – 1930. – Vol. 21. – I. 6. – P. 283–288.
120. Rodríguez-Suárez C., Atienza S. G. Polyphenol oxidase genes in *Hordeum chilense* and implications in tritordeum breeding // *Molecular Breeding*. – 2014. – Vol. 34. – I. 4. – P. 1867–1877.
121. Rogers C. E., Kreitner G. L. Phytomelanin of Sunflower Achenes: A Mechanism for Pericarp Resistance to Abrasion by Larvae of the Sunflower Moth (Lepidoptera: Pyralidae) // *Environmental Entomology*. – 1983. – Vol. 12. – I. 2. – P. 277–285.
122. Sakiroglu H., Küfrevioğlu Ö. I., Kocaçalışkan I., Oktay M., Onganer Y. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) Polyphenol Oxidase // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1996. – Vol. 44. – I. 10. – P. 2982–2986.

123. Sava V. M., Galkin B. N., Hong M. Y., Yang P. C., Huang G. S. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immunostimulating activity // *Food Research International*. – 2001. – Vol. 34. – I. 4. – P. 337–343.
124. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method // *Nature Protocols*. – 2008. – Vol. 3. – I. 6. – P. 1101–1108.
125. Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – I. 6. – P. 635–644.
126. Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – I. 13. – P. 1–22.
127. Shimizu B. I. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – Vol. 5.
128. Shoeva O. Y., Kukoeva T. V., Börner A., Khlestkina E. K. (2015). Barley Ant1 is a homolog of maize C1 and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath // *Plant Breeding*. – 2015. – Vol. 134. – I. 4. – P. 400–405.
129. Shoeva O. Y., Mock H. P., Kukoeva T. V., Börner A., Khlestkina E. K. Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black

- Grains of *Hordeum vulgare* // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11. – I. 10. – P. e0163782.
130. Shoeva O. Y., Strygina K. V., Khlestkina E. K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2018. – Vol. 22. – I. 3. – P. 333–342.
131. Shoeva O. Yu., Mursalimov S. R., Gracheva N. V., Glagoleva A. Yu., Börner A., Khlestkina E. K. Melanin formation in barley grain occurs within plastids of pericarp and husk cells // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – I. 1. – P. 179.
132. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes // *New Journal of Science*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–28.
133. Solovyev V. Statistical Approaches in Eukaryotic Gene Prediction. In *Handbook of Statistical Genetics / John Wiley and Sons, Ltd.* – 2004.
134. Strabala T. J., O'Donnell P. J., Smit A. M., Ampomah-Dwamena C., Martin E. J., Netzler N., Nieuwenhuizen N. J., Quinn B. D., Foote H. C. C., Hudson, K. R. Gain-of-function phenotypes of many *CLAVATA3/ESR* genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved *CLAVATA3/ESR* domain // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 140. – I. 4. – P. 1331–1344.
135. Strygina K. V., Börner A., Khlestkina E. K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis

- in barley aleurone // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17(Suppl 1). – P. 184.
136. Sun H., Wang L., Zhang B., Ma J., Hettenhausen C., Cao G., Sun G., Wu J., Wu J. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – Vol. 65. – I. 15. – P. 4305–4315.
137. Takeda K., Lin Chang C. Inheritance and geographical distribution of phenol reaction-less varieties of barley // *Euphytica*. – 1996. – Vol. 90. – I. 2. – P. 217–221.
138. Taketa S., Matsuki K., Amano S., Saisho D., Himi E., Shitsukawa N., Yuo T., Noda K., Takeda K. Duplicate polyphenol oxidase genes on barley chromosome 2H and their functional differentiation in the phenol reaction of spikes and grains // *Journal of Experimental Botany*. – 2010. – Vol. 61. – I. 14. – P. 3983–3993.
139. Taranto F., Pasqualone A., Mangini G., Tripodi P., Miazzi M., Pavan S., Montemurro C. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – I. 2. – P. 377.
140. Taylor L. P., Briggs W. R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings // *The Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2. – I. 2. – P.115–127.
141. Tena N., Martín J., Asuero A. G. (2020). State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and

- Therapeutic Effect in Human Health // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – I. 5. – P. 451.
142. Thomas M. Melanins. In Modern Methods of Plant Analysis / Springer Berlin Heidelberg. – 1955. – pp. 661–675.
143. Tran L. T., Taylor J. S., Constabel C. P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – P. 395.
144. Vahidzadeh E., Kalra A. P., Shankar K. Melanin-based electronics: From proton conductors to photovoltaics and beyond // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Vol. 122. – P. 127–139.
145. Varga M., Berkesi O., Darula Z., May N. V., Palágyi A. (2016). Structural characterization of allomelanin from black oat // Phytochemistry. – Vol. 130. – P. 313–320.
146. Vikhorev A. V., Glagoleva A. Y., Shmakov N. A., Kukoeva T. V., Khlestkina E. K., Shoeva O. Y. Study of melanin and anthocyanin biosynthesis regulation in barley grain by transcriptomic analysis of near-isogenic lines with different pigment composition // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021). – 2021. – P. 231.
147. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis // Molecular Plant. – 2010. – Vol. 3. – I. 1. – P. 2–20.
148. Wan L., Li B., Pandey M. K., Wu Y., Lei Y., Yan L., Dai X., Jiang H., Zhang J., Wei G., Varshney R. K., Liao B. Transcriptome analysis of a new

- peanut seed coat mutant for the physiological regulatory mechanism involved in seed coat cracking and pigmentation // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7.
149. Wang H., Pan Y., Tang X., Huang Z. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds // *LWT - Food Science and Technology*. – 2006. – Vol. 39. – I. 5. – P. 496–502.
150. Wang J., Feng J., Jia W., Chang S., Li S., Li Y. Lignin engineering through laccase modification: A promising field for energy plant improvement // *Biotechnology for Biofuels*. – 2015. – Vol. 8. – P. 145.
151. Wang L., Dossou S. S. K., Wei X., Zhang Y., Li D., Yu J., Zhang X. Transcriptome dynamics during black and white sesame (*Sesamum indicum* L.) seed development and identification of candidate genes associated with black pigmentation // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – I. 12. – P. 1–14.
152. Wang L. F., Rhim J. W. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink // *Lwt*. – 2019. – Vol. 99. – P. 17–23.
153. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F. T., de Beer T. A. P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – I. W1. – P. W296–W303.
154. Weisshaar B., Jenkins G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation // *Current Opinion in Plant Biology*. – 1998. – Vol. 1. – I. 3. – P. 251–257.

155. Weltzien E. Evaluation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Landrace Populations Originating from Different Growing Regions in the Near East // *Plant Breeding*. – 1998. – Vol. 101. – I. 2. – P. 95–106.
156. Wesche-Ebeling P., Montgomery M. W. Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization // *Journal of Food Science*. – 1990. – Vol. 55. – I. 5. – P. 1320–1324.
157. Wijk K. J., Kessler F. Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Environmental Adaptation // *Annual Review of Plant Biology*. – 2017. – Vol. 68. – I. 1. – P. 253–289.
158. Woodward R. W. Inheritance of a Melaninlike Pigment in the Glumes and Caryopses of Barley // *Journal of Agricultural Research*. – 1941. – Vol. 63. – I. 1. – P. 21–28.
159. Woodward R. W. Linkage Relationships between the Allelomorphic Series B, Bmb, Bg, and Atat Factors in Barley // *Agronomy Journal*. – 1942. – Vol. 34. – I. 7. – P. 659.
160. Yamaguchi Y. L., Ishida T., Sawa S. CLE peptides and their signaling pathways in plant development // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – Vol. 67. – I. 16. – P. 4813–4826.
161. Yang F., Li W., Jiang N., Yu H., Morohashi K., Ouma W. Z., Morales-Mantilla D. E., Gomez-Cano F. A., Mukundi E., Prada-Salcedo L. D., Velazquez R. A., Valentin J., Mejía-Guerra M. K., Gray J., Doseff A. I.,

- Grotewold E. A Maize Gene Regulatory Network for Phenolic Metabolism // *Molecular Plant*. – 2017. – Vol. 10. – I. 3. – P. 498–515.
162. Yao Z., Qi J., Wang L. Isolation, Fractionation and Characterization of Melanin-like Pigments from Chestnut (*Castanea mollissima*) Shells // *Journal of Food Science*. – 2012. – Vol. 77. – I. 6. – P. 671–676.
163. Yoruk R., Marshall M. R. Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A Review // *Journal of Food Biochemistry*. – 2003. – Vol. 27. – I. 5. – P. 361–422.
164. Yu C. Y. Molecular mechanism of manipulating seed coat coloration in oilseed Brassica species // *Journal of Applied Genetics*. – 2013. – Vol. 54. – I. 2. – P. 135–145.
165. Yu Y., Tang T., Qian Q., Wang Y., Yan M., Zeng D., Han B., Wu C. I., Shi S., Li J. Independent Losses of Function in a Polyphenol Oxidase in Rice: Differentiation in Grain Discoloration between Subspecies and the Role of Positive Selection under Domestication // *The Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – I. 11. – P. 2946–2959.
166. Zaprometov M. N., Nikolaeva T. N. Chloroplasts Isolated from Kidney Bean Leaves Are Capable of Phenolic Compound Biosynthesis // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 50. – I. 5. – P. 623–626.
167. Zherebin Yu. L., Litvina T. M. Production of water-soluble phytomelanins // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1991. – Vol. 27. – I. 5. – P. 649–650.

168. Zhou X., Chao M., Liang X. Screening and testing of barley varieties for scab resistance // *Acta Phytophylacica Sinica*. – 1991. – Vol. 18. – P. 261–265.
169. Zhu B. F., Si L., Wang Z., Jingjie Zhu Y. Z., Shangguan Y., Lu D., Fan, D., Li C., Lin H., Qian Q., Sang T., Zhou B., Minobe Y., Han B., Han B. Genetic Control of a Transition from Black to Straw-White Seed Hull in Rice Domestication // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 155. – I. 3. – P. 1301–1311.
170. Zhuravel O. I. The study of melanin from buckwheat (*Fagopyron saggitatum*) pericarps // *Farmatsevychnyi Zhurnal = Pharmaceutical Journal*. – 2010. – Vol. 6. – P. 93–96.
171. Аджиева А. Ф., Бабак А. Г., Шоева А. Ю., Кильчевский А. В., Хлесткина А. К. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – Т. 19. – №. 5. – С. 561–573.
172. Кобылянский В. Д., Лукьянова М. В. Культурная флора СССР. Том II, Ячмень / Ленинград: Агропромиздат. – 1990. – 421 с.
173. Юдина Р. С., Гордеева Е. И., Шоева О. Ю., Тихонова М. А., Хлесткина Е. К. (2021). Антоцианы как компоненты функционального питания // *Вавиловский Журнал Генетики и Селекции*. – 2021. – Т. 25. – №. 2. – С. 178–189.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Список образцов ячменя из коллекций ВИР и ИЦиГ, используемые в работе, а также результаты генотипирования при помощи ПЦР-маркеров из локуса *Vlp1*. А и В – обозначения аллелей, 0 – аллель неопределен.

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	МС_15 70156	HORVU1Hr1G086710	HORVU1Hr1G086760	HORVU1Hr1G086780	МС_42987	МС_488351	HORVU1Hr1G086790	HORVU1Hr1G086930	HORVU1Hr1G087050
VIR1	11749	Кыргызстан	да	В	А	В	В	В	В	А	А	В
VIR4	15788	Китай	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR5	15878	Китай	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR7	17027	Казахстан	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR9	17667	США	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR10	17881	Азербайджан	да	В	А	В	В	В	В	А	А	В
VIR11	17945	Узбекистан	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR12	17972	Иран	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR13	18685	Алжир	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR14	18696	Канада	да	В	А	В	В	В	В	А	А	А
VIR17	19771	Бельгия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR18	20006	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR19	20009	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR20	20068	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR21	20097	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR22	20099	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR23	20121	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR24	20533	Эфиопия	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В
VIR25	20662	Афганистан	да	В	А	В	В	В	В	В	А	В

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR27	22752	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR28	22930	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR29	23187	Иран	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR30	23219	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR31	23334	Турция	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR32	23442	Боливия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR33	24817	Ботсвана	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR34	24818	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR35	24823	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR36	24949	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	0	A	A
VIR37	24950	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR38	24952	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR39	25008	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR40	25304	Аргентина	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR41	25509	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR42	25541	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR43	25621	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR44	25626	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	0
VIR45	25803	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	0
VIR46	25804	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	0
VIR47	26254	Великобритания	да	B	A	B	0	B	B	0	A	B
VIR48	26303	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR49	26310	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR50	26311	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR51	27441	Чехословакия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR52	27442	Чехословакия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR53	27689	Германия	да	B	A	B	0	B	B	0	A	A
VIR54	27692	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR55	28125	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR56	29720	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR57	30613	Канада	да	B	A	B	B	B	B	0	A	B
VIR59	31079	Китай	да	0	A	B	0	B	B	0	A	B
VIR60	3282	Эфиопия	да	A	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR61	5144	Тунис	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR62	5445	Эфиопия	да	B	A	0	0	B	B	B	A	B
VIR63	5447	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR64	5448	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR65	7087	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR66	8682	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR67	17384	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR68	17554	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR69	18830	Эфиопия, Шоа(пров.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR70	18844	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR71	18853	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR72	19979	Эфиопия	да	0	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR73	19982	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR74	19997	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR75	20024	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR77	20040	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR78	20042	Эфиопия	да	A	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR79	20043	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR80	20048	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR81	20065	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	0
VIR82	20067	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR83	20077	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR85	20154	Эфиопия	да	B	A	B	0	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR86	20195	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR87	20519	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR89	20534	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR90	21126	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR91	21850	Эфиопия	да	0	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR92	21853	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR93	23255	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR94	23441	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR97	25010	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR98	26590	Эфиопия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR99	30808	Эфиопия	да	B	A	B	0	B	B	B	A	B
VIR100	3477	Китай	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR101	3502	Китай	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR102	12265	Китай	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR103	12284	Китай	да	B	A	B	B	B	B	0	A	A
VIR104	15151	Китай	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR106	15600	Китай	да	B	0	B	B	0	B	A	A	B
VIR107	15790	Китай	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR108	18996	Китай, Сычуань(пров.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR111	2765	Япония	да	B	A	B	0	B	B	A	A	A
VIR112	19068	Япония	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR114	31075	Непал	да	A	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR116	25872	Индия	да	A	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR117	19879	Аргентина	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR118	26750	Аргентина	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR119	21954	Аргентина, Кордова(пров.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR120	21567	Боливия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU1Hr1G086710	HORVU1Hr1G086760	HORVU1Hr1G086780	MC_42987	MC_488351	HORVU1Hr1G086790	HORVU1Hr1G086930	HORVU1Hr1G087050
VIR121	23378	Боливия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR122	27153	Боливия	да	B	0	B	0	B	B	B	A	B
VIR123	21551	Боливия, Ла-Пас(департамент)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR124	23400	Мексика	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR126	23306	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR127	30337	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR128	30387	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	0
VIR129	30388	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR130	30625	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR132	30643	Перу	да	B	0	B	B	B	B	B	A	B
VIR133	30658	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR134	30659	Перу	да	B	A	B	0	B	B	B	A	B
VIR135	30660	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR137	30676	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR139	30683	Перу	да	B	A	B	B	B	B	B	A	0
VIR140	17680	США	да	B	A	B	B	B	0	A	A	B
VIR141	24646	США	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR142	24970	США	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR144	26860	США	да	A	A	A	B	B	B	B	A	B
VIR145	26895	США	да	A	0	B	B	B	B	B	A	B
VIR146	3287	США,Аляска(штат)	да	B	A	B	B	B	0	B	0	B
VIR147	27989	Канада	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR148	1015	Канада,Онтарио(штат)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR149	18676	Канада,Онтарио(штат)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR150	18703	Канада,Онтарио(штат)	да	A	A	B	B	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Мела нин	МС_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	МС_ 4298 7	МС_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR153	17845	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	0	A	0
VIR154	11356	Азербайджа, Ганджа	да	B	A	B	B	B	B	0	A	0
VIR155	11358	Азербайджа, Ганджа	да	B	A	B	B	B	B	0	A	B
VIR156	11372	Азербайджа, Геокчайский(рай он)	да	B	A	B	B	B	B	0	A	0
VIR157	7141	Азербайджа, Джебраильский(район)	да	B	A	B	B	B	B	0	A	B
VIR158	7327	Азербайджа, Кубинский(райо н)	да	B	A	B	B	B	B	0	A	0
VIR159	7383	Азербайджа,Куб инский(район)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR160	7851	Азербайджан.Лен коранский(район)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR161	152	Азербайджа, Нагорный Карабах	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR162	11361	Азербайджа, Нагорный Карабах	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR163	7189	Азербайджа, Физулинский(ра йон)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR164	11917	Кыргызстан, Чуйский(район)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR165	3959	Монголия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR167	2959	Монголия, Кобдоский(айма к, обл.)	да	B	A	B	B	B	B	0	A	A
VIR168	2893	Туркменистан	да	B	0	B	0	B	B	A	A	B
VIR169	3108	Туркменистан	да	B	A	B	B	B	B	0	A	0

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR171	5911	Туркменистан	да	B	A	B	0	B	B	0	A	0
VIR172	26105	Узбекистан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR173	7998	Узбекистан, Бухарская(обл.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR175	22628	Ирак	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR176	2998	Иран	да	B	A	0	0	B	0	A	A	B
VIR177	3079	Иран	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR178	10046	Иран	да	B	A	B	B	B	0	A	A	B
VIR179	10382	Иран	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR180	22477	Иран	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR181	23176	Иран	да	B	0	A	0	B	B	0	A	B
VIR182	9100	Иран, Керманшахан(ос тан)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR183	3256	Сирия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR185	3302	Турция	да	B	A	B	B	B	B	0	A	B
VIR186	13241	Турция	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR187	19750	Турция	да	A	A	B	0	B	B	A	A	B
VIR188	8954	Турция, Ходжи Улук	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR189	176	Грузия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR190	1067	Дагестан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR191	4690	Армения	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR192	13233	Дагестан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR193	15287	Дагестан	да	B	A	B	B	B	B	A	0	B
VIR194	15288	Дагестан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR195	25306	Грузия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR196	1013	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR197	3673	Германия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR198	3740	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	A
VIR199	17586	Германия	да	B	0	B	B	B	B	A	A	A
VIR200	18067	Германия	да	B	A	B	0	B	B	A	A	B
VIR201	18569	Германия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR203	19684	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	A	0	A
VIR204	20250	Германия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR205	20921	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR206	20923	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR207	24825	Германия	да	B	A	B	0	B	B	B	A	B
VIR209	25793	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR210	26754	Германия	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR211	27295	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR212	28201	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR213	30098	Германия (до 1991г.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR214	19776	Бельгия	да	B	0	B	B	B	B	A	A	A
VIR216	25855	Франция	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR217	22784	Швеция	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR218	5477	Украина, Днепропетровск ая(обл.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR219	5484	Украина, Днепропетровск ая(обл.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR220	5488	Украина, Днепропетровск ая(обл.)	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR221	4289	Кировская(обл.)	да	B	0	B	B	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR223	14645	Краснодарский край	да	B	A	B	B	B	B	A	A	B
VIR224	30748	Кемеровская обл.	да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR226	7775	Греция, Родос	да	B	0	B	B	B	B	0	A	B
VIR228	W-90	Туркмения	да	B	A	B	B	B	B	0	A	A
VIR229	W-91	Туркмения	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR230	W-378	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR231	W-382	Азербайджан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR232	W-839	Казахстан	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
ICG22	8462	Швеция	да	0	A	B	B	A	B	B	A	B
ICG24	8461	Эфиопия	да	A	A	B	B	A	B	B	A	B
ICG102	8003	Белоруссия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
ICG104	8009	Белоруссия	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
ICG134	8321	Эфиопия	да	B	A	A	B	B	B	B	A	B
ICG151	8487	Мексика	нет	0	A	B	A	B	A	B	A	0
ICG159	BLP		да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
ICG160	mBLP		да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
ICG161	gBLP		да	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR222	8279	Саратовская(обл.)	да	B	A	B	B	B	B	A	A	A
VIR2	14760	Тува	нет	B	A	A	A	B	B	0	A	B
VIR3	15580	Китай	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
VIR6	15904	Китай	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	0
VIR8	17648	Греция	нет	B	A	B	A	B	B	B	A	B
VIR15	19273	Япония	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
VIR16	19274	Япония	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
VIR26	22591	Монголия	нет	B	B	B	A	B	A	B	A	B
VIR58	30831	Южная Корея	нет	0	A	B	A	B	A	0	A	B
VIR76	20028	Эфиопия	нет	0	A	A	A	B	B	B	B	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR84	20079	Эфиопия	нет	B	A	B	A	B	B	B	A	0
VIR88	20526	Эфиопия	нет	0	B	A	A	B	B	B	B	B
VIR95	23444	Эфиопия	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR96	23454	Эфиопия	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR105	15160	Китай	нет	A	B	A	A	B	B	B	A	B
VIR109	18992	Китай, Тибетский(авт.р айон)	нет	B	A	A	A	B	B	B	A	B
VIR110	22430	Китай, Тибетский(авт.р айон)	нет	B	B	A	A	B	B	0	A	B
VIR113	20469	Япония	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
VIR115	26648	Пакистан	нет	B	B	B	A	B	A	B	A	B
VIR125	28057	Мексика	нет	B	B	B	A	A	A	B	A	B
VIR131	30633	Перу	нет	B	0	B	B	B	B	B	A	B
VIR136	30675	Перу	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR138	30681	Перу	нет	B	0	B	0	B	B	B	A	B
VIR143	25816	США	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR151	18723	Канада, Онтарио(штат)	нет	B	A	B	A	B	0	B	A	B
VIR152	18729	Канада, Онтарио(штат)	нет	B	A	B	A	B	0	B	A	B
VIR166	23728	Монголия	нет	B	A	0	0	A	0	B	A	A
VIR170	5908	Туркменистан	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
VIR174	22603	Ирак	нет	B	A	B	A	B	A	0	A	B
VIR184	25617	Сирия	нет	B	A	B	0	B	B	0	A	B
VIR202	18575	Германия	нет	B	B	B	A	B	A	B	0	A
VIR208	25789	Германия (до 1991г.)	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
VIR215	29820	Бельгия	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B
VIR225	31390	Челябинская обл.	нет	B	A	B	B	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
VIR227	W-69	Афганистан	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ICG1	8524	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG2	8525	Васхнил	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG3	8526	Васхнил	нет	B	B	A	0	B	B	B	A	B
ICG4	8527	Васхнил	нет	A	A	A	0	A	B	B	A	A
ICG5	8528	Польша	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG6	8529	Васхнил	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG7	8530	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG8	8531	Васхнил	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG9	8532	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	B	B
ICG10	8533	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG11	8534	Васхнил	нет	B	A	A	A	A	B	B	A	B
ICG12	8535	Васхнил	нет	A	A	A	A	B	A	B	B	B
ICG13	8536	Васхнил	нет	A	A	A	A	B	A	B	B	B
ICG14	8537	Васхнил	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG15	8538	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	B	B
ICG16	8539	Швеция	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG17	8540	Васхнил	нет	0	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG18	8542	Васхнил	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG19	8268	Свердловск	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG20	8458	Омская обл.	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG21	8457	Омская обл.	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG23	8459	Дагеснан	нет	B	A	A	A	B	B	B	A	B
ICG25	8504	Монголия	нет	B	A	A	A	B	B	B	A	B
ICG26	8463	Красноярский край	нет	A	0	A	A	A	0	B	B	B
ICG27	8293	Новосибирск ИЦиГ	нет	B	B	A	A	A	B	B	A	B
ICG28	8448	кол.Гольшевой	нет	B	0	A	A	A	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Мела нин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
ICG29	8451	кол.Гольшевой	нет	B	B	A	A	A	B	B	A	B
ICG30	8456	кол.Гольшевой	нет	B	B	A	A	A	B	B	A	B
ICG31	8013	Бурятия	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG32	8014	Свердловск	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG33	8026	ИЦиГ кол.Гольшевой	нет	B	A	A	A	B	A	B	B	B
ICG34	8027	Челябинская обл.	нет	A	A	A	A	0	A	B	A	A
ICG35	8028	Новосибирская обл.	нет	A	A	A	A	0	A	B	B	B
ICG36	8031	Новосибирскя обл.	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG37	8032	Алтайский край	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG38	8042	Омская обл.	нет	B	A	B	A	A	A	B	A	A
ICG39	8055	Ленинград	нет	0	A	0	A	A	A	B	A	A
ICG40	8065	Ростовская обл.	нет	B	A	B	A	B	0	B	A	0
ICG41	8066	Ленинград	нет	B	B	A	A	0	B	B	A	0
ICG42	8044	Белоруссия	нет	B	B	A	A	A	A	B	B	B
ICG43	8075	Кемеровская обл.	нет	B	A	A	A	A	0	B	A	A
ICG44	8071	США хром.1,3	нет	B	B	B	A	0	A	B	A	0
ICG45	8077	Ростовская обл.	нет	A	A	A	A	B	0	B	A	A
ICG46	8080	Красноярский край	нет	0	0	A	A	A	A	B	A	A
ICG47	8092	Казахстан	нет	0	0	A	A	0	A	B	A	A
ICG48	8152	Казахстан	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG49	8127	Крым	нет	B	B	A	A	0	B	B	A	B
ICG50	8130	Московская обл.	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG51	8136	Кировская обл.	нет	A	B	A	A	B	0	B	0	A
ICG52	8139	Воронеж	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG53	8157	Иркутская обл.	нет	0	0	A	A	0	A	B	0	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Мела нин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
ICG54	8158	Челябинская обл.	нет	B	B	A	A	B	0	B	A	B
ICG55	8159	Красноярский край	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG56	8161	Красноярский край	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	A
ICG57	8174	Бурятия	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	A
ICG58	8177	Ленинград	нет	B	A	0	A	B	0	B	A	B
ICG59	8203	Якутия	нет	B	B	A	A	A	A	B	B	B
ICG60	8204	Нарымская ОС	нет	A	0	A	A	A	A	B	A	B
ICG61	8209	Иркутская обл.	нет	B	B	A	A	A	A	B	B	A
ICG62	8211	Приморский край	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	0
ICG63	8214	Омская обл.	нет	B	A	0	A	B	0	B	A	B
ICG64	8217	Самарская обл.	нет	0	0	A	A	B	B	B	A	B
ICG65	8218	Бурятия	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG66	8228	Иркутская обл.	нет	B	0	B	A	B	A	B	A	B
ICG67	8236	Московская обл.	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG68	8242	Омская обл.	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG69	8243	Новосибирская обл.	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG70	8246	Краснодарский край	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG71	8248	Оренбургская обл.	нет	A	A	0	A	A	0	B	A	A
ICG72	8255	Черниговская обл.	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG73	8260	Свердловск	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG74	8265	Омская обл.	нет	A	0	A	A	B	B	B	B	B
ICG75	8266	Ростовская обл.	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG76	8267	Куйбышевская обл.	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
ICG77	8271	Красноярский край	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG78	8275	Новосибирская обл.	нет	0	0	0	A	B	B	B	0	B
ICG79	8279	Краснодарский край	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG80	8282	Краснодарский край	нет	A	0	A	A	A	A	B	A	A
ICG81	8283	Кировская обл.	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG82	8286	Ставропольский край	нет	B	A	A	A	0	0	B	A	A
ICG83	8287	Томская обл.	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG84	8316	Свердловск	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG85	8322	Казахстан	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG86	8344	Казахстан	нет	B	0	A	A	A	A	B	A	A
ICG87	8413	Оренбургская обл.	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG88	8414	Ростовская обл.	нет	B	0	A	A	A	A	B	A	A
ICG89	8425	Новосибирская обл.	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG90	8430	Барабинский сортоуч	нет	A	A	B	0	A	A	B	A	A
ICG91	8434	Казахстан	нет	B	B	A	A	A	0	B	A	B
ICG92	8435	Барнаул	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ICG93	8437	Новосибирская обл.	нет	A	B	A	A	B	0	B	B	B
ICG94	8436	ИЦиГ	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG95	8465	Нарымская обл.	нет	B	0	A	A	B	B	B	A	B
ICG96	8375	Красноярский край	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ICG97	8547	Красноярский край	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG98	8548	Красноярский край	нет	A	A	A	A	A	A	B	B	B

Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
ICG99	8040	Киргизия	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG100	8053	Украина	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG101	8000	Австралия	нет	A	A	A	A	0	0	B	A	A
ICG103	8007	США	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG105	8010	Украина	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG106	8015	США хром.5	нет	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ICG107	8018	США хром.2	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG108	8020	Канада	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG109	8021	6 США хром.5	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG110	8023	США	нет	B	B	A	A	A	A	B	A	A
ICG111	8025	Белоруссия	нет	B	B	A	A	A	A	B	A	B
ICG112	8033	Франция	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG113	8041	США хром.7	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG114	8121	Мексика	нет	B	A	B	A	B	B	B	B	B
ICG115	8153	Иран	нет	B	A	B	A	B	B	B	A	0
ICG116	8167	Швеция	нет	B	B	A	A	A	A	B	B	B
ICG117	8200	Швеция	нет	A	A	A	A	A	0	B	A	A
ICG118	8205	Англия	нет	A	A	A	A	0	A	B	A	A
ICG119	8219	Дания	нет	B	0	A	A	A	A	B	A	A
ICG120	8220	Австралия	нет	B	0	0	A	B	B	B	A	B
ICG121	8222	Англия	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG122	8226	Аляска	нет	B	A	A	A	0	A	B	A	B
ICG123	8233	Приморский край	нет	B	A	A	A	B	A	B	A	0
ICG124	8234	Германия	нет	A	A	A	A	B	A	B	A	A
ICG125	8244	Молдова	нет	0	A	B	A	B	B	B	A	0
ICG126	8277	Казахстан	нет	B	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG127	8299	Германия	нет	A	B	A	A	B	0	B	A	B
ICG128	8300	Германия	нет	A	A	0	A	B	B	B	A	0















Номер	Кат.№ ВИР (ИЦиГ)	Происхождение	Меланин	MC_15 70156	HORVU 1Hr1G08 6710	HORVU1H r1G086760	HORVU1H r1G086780	MC_ 4298 7	MC_48 8351	HORVU1 Hr1G0867 90	HORVU1H r1G086930	HORVU1H r1G087050
ICG129	8302	Германия	нет	B	A	A	A	0	0	B	A	0
ICG130	8307	Чехословакия	нет	A	B	B	A	B	B	B	B	B
ICG131	8308	Чехословакия	нет	A	0	A	A	B	B	B	A	B
ICG132	8318	Польша	нет	A	B	A	A	B	B	B	B	B
ICG133	8319	Нидерланды	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG135	8331	Норвегия	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG136	8332	Финляндия	нет	B	B	A	A	A	A	B	B	B
ICG137	8333	Венгрия	нет	A	A	A	A	B	0	B	A	0
ICG138	8338	Казахстан	нет	A	0	A	A	B	0	B	A	0
ICG139	8356	США	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG140	8369	США	нет	A	0	A	A	B	0	B	A	B
ICG141	8391	Швеция	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A
ICG142	8392	Аляска	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	B
ICG143	8393	Англия	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	B
ICG144	8400	Швеция	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	0
ICG145	8401	Дания	нет	A	A	A	A	0	0	B	A	0
ICG146	8407	Швеция	нет	A	A	A	A	A	0	B	A	A
ICG147	8408	США	нет	A	A	A	A	B	0	B	A	B
ICG148	8422	Башкирия	нет	A	A	A	A	0	0	B	A	0
ICG149	8460	Япония	нет	B	A	A	A	B	B	B	A	B
ICG150	8484	Мексика	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	0
ICG152	8488	Мексика	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	0
ICG153	8489	Мексика	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	0
ICG154	8493	Индия	нет	B	A	A	A	B	A	B	A	0
ICG155	8501	Канада	нет	B	B	A	A	B	B	B	A	0
ICG156	8502	Австралия	нет	A	A	A	A	A	A	B	A	0
ICG157	8503	Австралия	нет	B	A	A	A	A	0	B	A	0
ICG158	Bowman		нет	A	A	A	A	A	A	B	A	A

Приложение 2. Характеристики праймеров, используемых в работе.

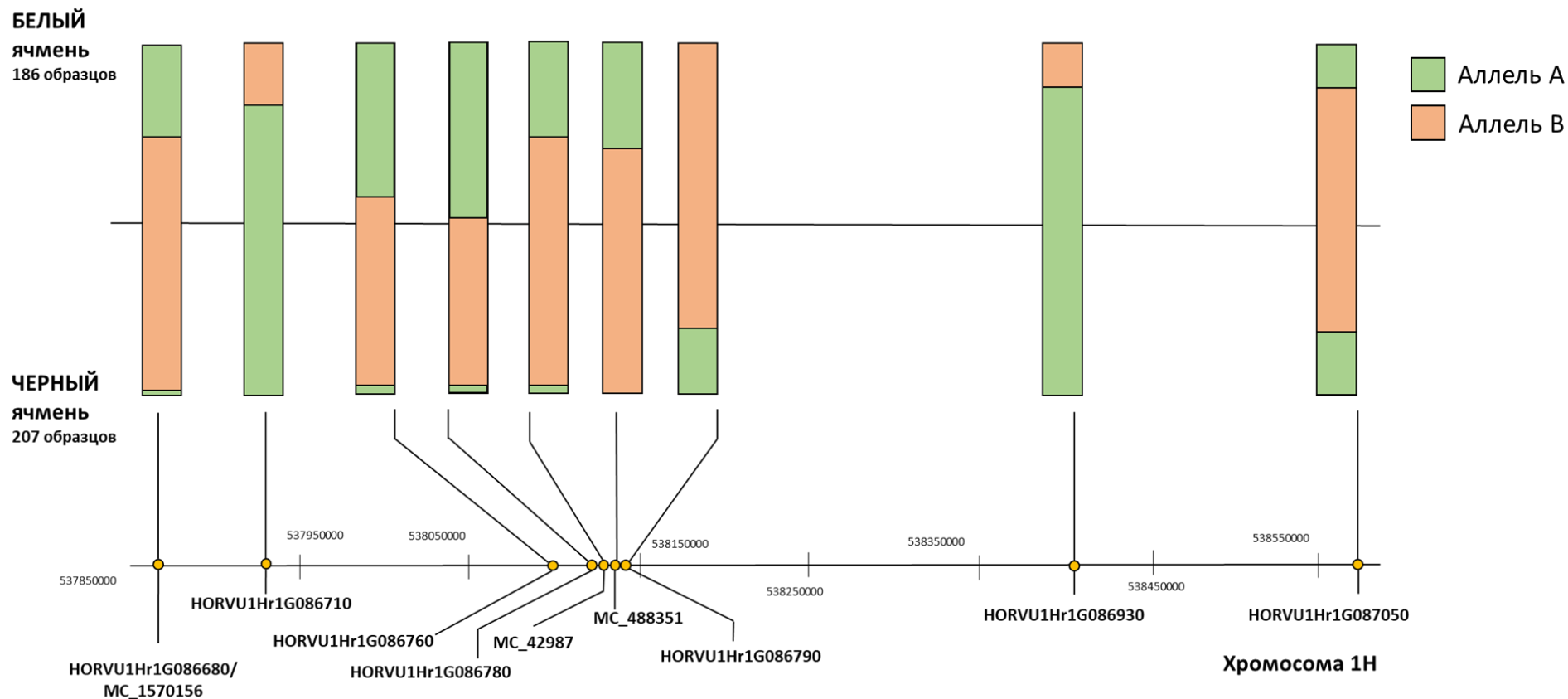
Цель	Название гена/маркера	Последовательность прямого праймера, 5'-3'	Последовательность обратного праймера, 5'-3'	Температура отжига	Длина ПЦР продукта
Генотипирование	MC_1570156	CGCCTCTACATACTTCAAGGGT	CTGTGGCTACTGCAAAGTTTGT	55	119
	HORVU1Hr1G086710	ATCACTACGCTGACAAACTC	TGCTTATGGACGTGAACT	55	98
	HORVU1Hr1G086760	CTCACTCACACACACACATAC	ACCAGCCATCTCCTTCTAC	55	143
	HORVU1Hr1G086780	TTGCTGTACATACCAGGTAG	CGAAAGCGGAAGAGAGAAG	55	116
		CTTGCTCTACATATACCAGGTAC			119
	MC_42987	CATCGGATCACATCGCATCG	AAGTGGCCAGCAACGAAATG	55	148
	MC_488351	TACCGTTGCATCGTTGGACA	CACAAATATGCCAGCGACGG	55	173
	HORVU1Hr1G086790	GTGTGGTGGAAAGTGGAAC	AGGAGGTGGCTGGTTTAT	55	195
	HORVU1Hr1G086930	TTCTAGCACCACGAGTTTG	GCGGTGAGGAATGATACAG	55	167
	HORVU1Hr1G087050	CTTCTGGGTGATGATTTCCA	TGGTACTTTCAATGTTGTCTC	55	82
	Ppo1_U004	TCTCATGCGAGGCAACTG	TTCTGCTGGCTCTTCTTC	55	123/131
	Ppo2_I677	CACAGTTCACCATGGAGATGA	AGGGCCTGGAGGTTGCTC	55	88/96
Анализ экспрессии	Ppo1	CTGGCCAAGTACGAGAGG	AGAGCCAGCAGAAGTGTATC	60	163
	Ppo2	AGCAAGGAGAAGGAGGAG	GCACGTCGAACTTGATGA	60	91
	Ppo3	CTGCGTGTTCCTCATCA	GCATGGGTTCAGGGAGA	60	79

Цель	Название гена/маркера	Последовательность прямого праймера, 5'-3'	Последовательность обратного праймера, 5'-3'	Температура отжига	Длина ПЦР продукта
Анализ экспрессии	Ppo4	TTCTACGACGAGGACTG	GAAGGGATAGTGGGAATCTG	60	181
	Pal	GCTCATGTTTGCCCAATTC	GGAAAGGTTGGAAGGTAGAC	60	71
	C4h	GCCATGGACAACAACG	GATCTCCCCCTTCTGCTC	60	69
	4Cl	GAGAGAACCCGAACCTG	GAGTTGAGCGAGTAGATGTG	60	82
	Hct	TGGA CTACACCGACGACA	GTCACCTGAAGCACGAG	60	52
	C3'h	TCAAGGAGAGCGGTGCTA	TGGCCCATTCGACTGATATG	60	150
	Comt	CAAGAAGTACCCGAGCATAAA	CGGCACCATCTCAAACAT	60	115
	CLE_exp	GCATTCACCCAGCACATA	CGAAAGCGGAAGAGAGAAG	60	188
	HvActin	TCGCAACTTAGAAGCACTTCCG	AAGTACAGTGTCTGGATTGGAGG G	60	130
Секвенирование	CLE_F1/R1	AAGGACTACCAACCGATCT	AAACGTCCTGTGGCTATTG	55	460

Приложение 3. Результаты качественных реакция на антоцианы (верхний ряд) и меланины (нижний ряд) в образцах ячменя с известным пигментным составом. Bw- Bowman (нет пигментов), BLP – *i:BwBlp1* (NIL с меланинами в цветковых чешуях и перикарпе), PLP – *i:BwAnt1Ant2* (NIL с антоцианами в перикарпе), BLP*PLP – *i:BwAnt1Ant2Blp1* (NIL с меланинами и антоцианами в чешуях и перикарпе), BA – *i:BwIb11* (NIL с антоцианами в алейроновом слое), DOM (антоцианы в алейроне и перикарпе, меланины в перикарпе и цветковых чешуях) и REC (нет пигментов) родители популяции Oregon Wolfe Barleys.

	Bw	BLP	PLP	BLP*PLP	BA	DOM	REC
1% HCl в метаноле							
2% NaOH							
Антоцианы	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗
Меланины	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗

Приложение 4. Схема распределения частот аллелей ПЦР-маркеров в коллекциях ячменя с меланином зерновке (черный ячмень) и без меланина (белый ячмень).



Приложение 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей генов *Pro*. Желтым выделены медьсодержащие домены – CuA и CuB.

```

PP01      MESTRMILSVTPSMPCGLQTLARRNLVRAL  HHRKDAQPRRLSCEATGGRRVDRRDVLLGLGAAAAGLGAQRD
PP02      MEMSITSAPRCTTTLGTMRPSNLQALVPKGAHALLRDREKARQPRRLACKATGGR  VDRRDVLLGLGSAAGLQTRRG
PP03      MANGHRAPLLTACVFLIICAATLVVVYTAFFVSLNPCTYSLPRALITVSGLRPYVVS  CQGDADTAPLSDG
PP04      MASNRGACAPHGIAACVFLVGA VATVVYITSS      SLSTALLAVSGLPPYIVSVTTNGS      G

PP01      ALAAPIQAPDFLNCNPPDLNTPPDASCRRRTATAPLSPTSGRRPPR  RSACVRRPHLVDA  ESLAKYERAVALMKQ
PP02      RGAIAAPIQAPDLGNCNPPPELNTAPDTNCCPTSGTGITDFVLPPAASSA  PLRVRPA AHLVDA  GHLAKYERAVALMKQ
PP03      SKKTGGPVETSLRTCVKPTLPHPPLPPFYCCPPAPAS  EPINFTLPDPAEPVRRRPTHAAAGAAEHMAKYERAIALMRA
PP04      DINVGGPLETSLTCHKPKLPPNPLPPFYCCPPAPASSSEPINFTLPDPAEPLRVRRVHTVGA  EYMAKYERAIALMKA

PP01      LPADDPRSFEQQWRVHCAIYCGAVFDQVGFDDLEIQIHPCWLFPPMHRLLYLYFHERILGKLI  GDDTFALPFWNWDAPDGMS
PP02      LPADDPRSFEQQWRVHCAIYCDGAYDQAGFPDLEIQVHNCWLEFPMHRLLYLYFHERILGKLI  GDDTFALPFWNWDAPGGMT
PP03      LPDDPRSFYQLANVHCAICTGSYRQTGHEPELHMQIHFSWLFPPHLYLYFFERIAAARLLGDP  GFALPFNGWDVPEGMR
PP04      LPHTDPRSFYQMANIHCAICTGSYRQTGNQELDMQIHLSWFFPPHRAIYLYFFERIAAKLLG  EPDFALPFNSWDVDPGMR

PP01      LPAIYANGSSPLYNERDDPAHQPPFFLDLDYSDTDANISRDLIDQNLKIMYRQMVSDAKKREL  FLGQPYRAGDQPD TGA
PP02      VPAMYANTSSPLYNQRRDPAHQPPFFVDLDYNEVDVVPTDEQIDQNLKIMYRQMVSSAKKTQ  LFMGQPYRAGDQPD PGA
PP03      MPAEFANSSSPLYDPA RNPAHAPPVVDLDFARVEGNLTDEQRVQQNLKIMYRQMVGNAA  LPSLPHGQPF RAGQSDMPGA
PP04      MPPEFANSSS SLYDVRNPTTHAPPRVVDLGFVGVESNRTDDQIQYNLRIMYKQMSNAAL  PSLPHGQPF RAGQSDKPGF

PP01      GSVENVPHGPFVHRWTGDPAQPNREDMGNFYSAARDPIFFAHHGNIIDRLMHWVRGLRP      SNTDFTDPDWLDA AFLFY
PP02      GSMENVPHGIVHTWTGDPAQPNREDMGNFYSAARDPIFFAHGANIDRLMHWVRGLRP      GNADFADADWLDA AFLFY
PP03      GTVELTPHNAMHTWTGDLTLRNVEHMGVHGRDPLFYPHHGNIIDRLMEAWRDVGAARGYR  GEVDFDTPDWLDS SFLFY
PP04      GAVELSPHNTVHTWTGDIALTNVEDMGTYYSAGRDP LFYPHEHNMIDRLMEAWREVGA  ARGYRGEVDFDTPDWLDS SFLFY

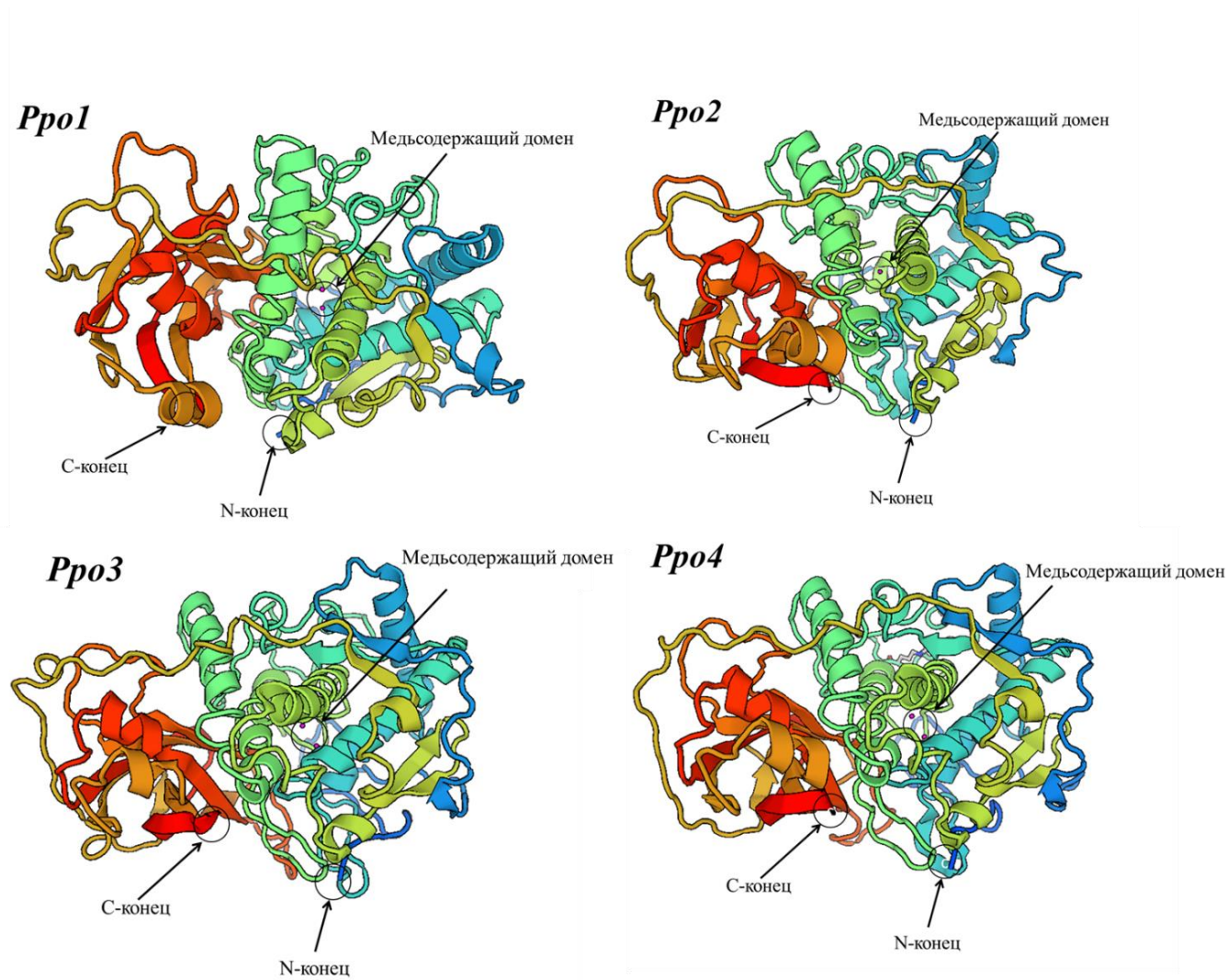
PP01      DEEARLVRVRVVDCLDTAALRYTYQDVGLPWLNARPAKASAGTP      APATTGTLPATLDR TIRVTVTRPRVSRSR
PP02      DEEARLVRVRVVDCLDLAAMGYAYQDVGLPWLEAKPAKRSAGTP      APAA GALPATLGETVRVTVTRPQVSRSS
PP03      DEEARLVRITVRDVLDDVDRYRFDVGMPPADARPSPTPNVNGNKPS SSSSSSLKSVSFP  LSLTAVTVEVRRRPRVLRGR
PP04      DEDCLVRITVREVLDTTEKLR YKFDVGMPPVDA SPPTPNLSKNK      ALLKSVRFP LSLHNVVTVVRRPHVLRRT

PP01      REKDEEEVVLVVEGIQIADHFNKFKFDVLVNEPERAVGGTPATATG  YCAGSFAYTPHMARSDEM RNPVKTVARFGVCD
PP02      KEKEEAEVLIIEGIEVADHFNKFIKFDVLVNEPESGGDG      ASGYCAGSVALTPHMVRTNE  KKGSVKTVARFGVCD
PP03      PEKEVHEEVLVVEGIEFDG  TEMVKFDAYVNAMEYEKVG P      SGRELAGSYLCLSHPST DGTGKGMTVETS MRMALNE
PP04      QEKEAREEVLVIQIEADG  TEMVKFDVYMN AIEYEKVEP      SGRELAGSYVCLSHPRMDGTG  KGMIVETS MRVALNQ

PP01      LMDDIGADGDKTVVSVLVPRCGCEMVTGGVVISYLK
PP02      LMDNIGADGDKTVVSVLVPRCGGELVTGGVSVGYAK
PP03      LLEDLGADGDESVTVLVPRHG  KVKIGGLKIVYHME
PP04      LLEDLDADGDETVTVLVPRHG  KAKIGSLRIVYMVD

```

Приложение 7. Третичные структуры, предсказанные на основе аминокислотных последовательностей генов *Ppo1* – *Ppo4* с помощью программы SWISS-MODEL.



Приложение 8. Гены *Ppo* разных видов растений, используемых для кластерного анализа.

Вид	Название гена на Рис.13	Номер в базе данных
<i>Hordeum vulgare</i>	PPO-1	HORVU2Hr1G103040 ^e
	PPO-2	HORVU2Hr1G103000 ^e
	PPO-3	HORVU3Hr1G077790 ^e
	PPO-4	HORVU4Hr1G090870 ^e
<i>Hordeum chilense</i>	PPO-1	AJD79224 ⁿ
	PPO-2	AJD79225 ⁿ
<i>Aegilops tauschii</i>	PPO-1	AET2Gv21033600 ^e
	PPO-2	XP_020176750 ⁿ
	PPO-4	XP_020162056 ⁿ
<i>Triticum urartu</i>	PPO-1	ACB12081 ⁿ
	PPO-3	TRIUR3_06458 ^e
<i>Triticum aestivum</i>	PPO-A1	TraesCS2A02G468200 ^e
	PPO-B1	TraesCS2B02G491000 ^e
	PPO-D1	TraesCS2D02G468200 ^e
	PPO-A2	TraesCS2A02G468500 ^e
	PPO-B2	TraesCS2B02G491400 ^e
	PPO-D2	TraesCS2D02G468600 ^e
	PPO-A3	TraesCS3A02G326600 ^e
	PPO-B3	TraesCS3B02G355900 ^e
	PPO-4B	TraesCS4B02G385600 ^e
	PPO-4D1	TraesCS4D02G359200 ^e
PPO-4D2	TraesCS4D02G358500 ^e	
<i>Oryza sativa</i>	PPO-1	Os04g0624500 ^e
	PPO-2	Os01g0793300 ^e
<i>Zea mays</i>	PPO-1	Zm00001eb388240 ^e
	PPO-2	Zm00001eb428900 ^e
<i>Sorghum bicolor</i>	PPO-1	SORBI_3006G181400 ^e
	PPO-2	SORBI_3010G192700 ^e
<i>Brachypodium distachyon</i>	PPO-1	BRADI_5g22300v3 ^e
	PPO-2	BRADI_2g52090v3 ^e
<i>Dioscorea rotundata</i>	PPO	DRNTG_27915 ^e

^e – база данных Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>)

ⁿ – база данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)