

*На правах рукописи*

ГЛАГОЛЕВА АНАСТАСИЯ ЮРЬЕВНА

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОВ  
БИОСИНТЕЗА МЕЛАНИНА В КОЛОСЕ  
ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*)**

Генетика – 1.5.7.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Шоева Олеся Юрьевна**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий сектором функциональной генетики злаков

Официальные оппоненты: **Лутова Людмила Алексеевна**  
доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского Государственного Университета (СПбГУ), г. Санкт-Петербург

**Осипова Светлана Владимировна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиолого-биохимической адаптации ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук» (СИФИБР СО РАН), г. Иркутск

Ведущее учреждение: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.  
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

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

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень её разработанности.** 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 (Сессарецци et al., 1987; Grotewold, 2006; Brunetti et al., 2013; 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. Меланины представляют собой химически инертные соединения, нерастворимые в воде и большинстве растворителей (Nicolas et al., 1994; Jana and Mukherjee, 2014). 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 (Сессарецци et al., 1987; Jana and Mukherjee, 2014; Choo et al., 2015). Известно, что меланины растений являются продуктами окисления и полимеризации фенольных соединений при участии ферментов полифенолоксидаз (РРО). 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 РРО 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 1*), 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*. Для изучения влияния гена *Blp1* на активность ключевых генов пути биосинтеза фенилпропаноидов был проведен сравнительный анализ их экспрессии в динамике созревания колоса. 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 биосинтез 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 наиболее вероятный 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:Ww*Blp1* и исходном сорте Bowman было показано, что гены *Pal*, *C4h* и *4Cl* являются наиболее транскрипционно активными в развивающемся колосе, однако на поздних стадиях созревания колоса в линии с меланином в зерновке (i:Ww*Blp1*) происходит вторичная активация данных генов, 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 гены, 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, показано участие данного гена в синтезе меланина. Таким образом, была впервые выдвинута гипотеза о специфической активации гена *Ppo2* геном *Blp1*.

**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 *Blp1* 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 *Blp1*, контролирующего биосинтез меланина в зерновке ячменя.

2. В присутствии доминантного аллеля гена *Blp1* происходит вторичная активация экспрессии ключевых генов биосинтеза фенилпропаноидов (*Pal*, *C4h*, *4Cl*) в перикарпе и цветковых чешуях ячменя.

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

**Вклад автора.** Все описанные в данной работе научные результаты были получены автором самостоятельно.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены на восьми научных конференциях и школах молодых учёных в виде устных и стендовых докладов. По материалам работы опубликованы три статьи в зарубежных рецензируемых журналах.

**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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

**Растительный материал.** Для проведения ассоциативного картирования гена *Blp1* был использован материал коллекций ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (232 образца) и Института цитологии и генетики СО РАН (161 образец), включающий образцы как культурного (*Hordeum vulgare* L.), так и дикого ячменя (*Hordeum spontaneum* Koch.). Для

сравнительного анализа экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов и полифенолоксидаз была использована почти-изогенная линия *i:VwB1p1*, характеризующаяся присутствием меланина в оболочках зерновки, и исходный непигментированный сорт Bowman (Druka et al., 2011). Для проверки участия гена *Ppo2* в синтезе меланина были использованы линии U004 и I677, несущие рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2* (Taketa et al., 2010), при скрещивании которых с линией *i:VwB1p1* были получены две популяции F<sub>2</sub>: U004 x *i:VwB1p1* (124 растения) и I677 x *i:VwB1p1* (202 растения).

***In silico* анализ последовательностей генов.** Поиск полиморфных участков генов из локуса *B1p1* проводился в семи образцах ячменя: двух образцах с черной окраской зерновки и двух неокрашенных, опубликованных Long et al., 2019, а также трех сортах: Bowman, Morex и Varke, нуклеотидные последовательности которых доступны в базе данных IPK Gatersleben (<https://galaxy-web.ipk-gatersleben.de/>). Для разработки маркеров к выбранным полиморфным сайтам была использована программа IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>). Поиск гомологичных последовательностей генов *Ppo* ячменя и 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 FGESH+ (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.

**Фенотипирование и генотипирование коллекций ячменя.** Для определения пигментного состава зерна проводились как визуальная оценка окраски зерновки, так и качественные реакции на антоцианы (экстракция в 1% HCl в метаноле с последующим окрашиванием раствора в розовый цвет) и меланины (экстракция в 2% растворе NaOH с последующим почернением раствора). Генотипирование коллекций ячменя проводилось с использованием метода ПЦР с последующим разделением продуктов в агарозном геле, а также с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. В качестве контроля точности разделения аллелей и выявления аллелей гена-кандидата на роль *B1p1*, применялся метод секвенирования по Сенгеру. Обработка результатов генотипирования, включая подсчет частот аллелей в коллекциях ячменя с меланином в зерне и без, определение значений  $\chi^2$  и p-value для каждого маркера, была выполнена при помощи программы Haploview (Barrett et al., 2005).

**Анализ экспрессии генов.** Была выделена РНК из следующих органов ячменя: корни и coleoptile на стадии четырехдневных проростков, стебли – на стадии удлинения стебля, развивающиеся колоски на стадии выхода в трубку, перикарп зерновки и цветковые чешуи на молочно-восковой и восковой стадиях спелости колоса. кДНК была синтезирована из 1 мкг суммарной РНК с помощью реакции обратной транскрипции. Для количественной оценки уровня экспрессии генов использовали ПЦР в режиме реального времени.

## Результаты и обсуждение

### *Ассоциативное картирование и анализ гена-кандидата на роль *Blp1**

Для выявления гена локуса *Blp1*, контролирующего формирование меланина в колосе ячменя, в данной работе был применен метод ассоциативного картирования. Для этого был проведен анализ частоты встречаемости полиморфизмов из данного локуса в коллекциях ячменя с меланином (207 образцов) и без меланина (186 образцов) в зерновке для последующего поиска ассоциаций полиморфизмов с наличием признака. Поиск полиморфных районов осуществляется при помощи *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей данного локуса у семи образцов ячменя: двух чернокрашенных (W1, X1) и двух неокрашенных (Baudin, Metcalfe) из статьи Long et al., 2019, а также у трех сортов с неокрашенной зерновкой: Bowman, Morex, Varke. Далее для выбранных полиморфных участков были разработаны и протестированы ПЦР-маркеры, среди которых для дальнейшего анализа были выбраны девять биаллельных маркеров, которые целиком охватывают локус *Blp1* (Таблица 1).

**Таблица 1.** Характеристики ПЦР-маркеров, используемых в данной работе, и частоты встречаемости их аллелей в коллекциях чернокрашенного и неокрашенного ячменя.

Название гена/маркера	Обозначение аллелей		Черные		Белые		$\chi^2$	p-value
	Аллель А	Аллель В	А,%	В,%	А,%	В,%		
MC_1570156	делеция ~6bp	нет делеции	4,5	95,5	42,9	57,1	159,704	1,31E-36
HORVU1Hr1G086710	делеция 15bp	нет делеции	100,0	0,0	66,7	33,3	154,862	1,5E-35
HORVU1Hr1G086760	делеция 15bp	нет делеции	1,5	98,5	78,7	21,3	485,242	1,5E-107
HORVU1Hr1G086780	SNP: G	SNP: C	0,0	100,0	96,1	3,9	679,981	6,7E-150
MC_42987	делеция 10bp	нет делеции	1,0	99,0	40,7	59,3	191,88	1,24E-43
MC_488351	делеция 42bp	нет делеции	0,5	99,5	57,2	42,8	302,873	7,8E-68
HORVU1Hr1G086790	делеция 28bp	нет делеции	45,7	54,3	0,0	100,0	215,918	7,03E-49
HORVU1Hr1G086930	нет делеции	делеция 11bp	100,0	0,0	85,7	14,3	62,495	2,67E-15
HORVU1Hr1G087050	нет делеции	делеция ~6bp	27,3	72,7	39,3	60,7	11,471	0,0007

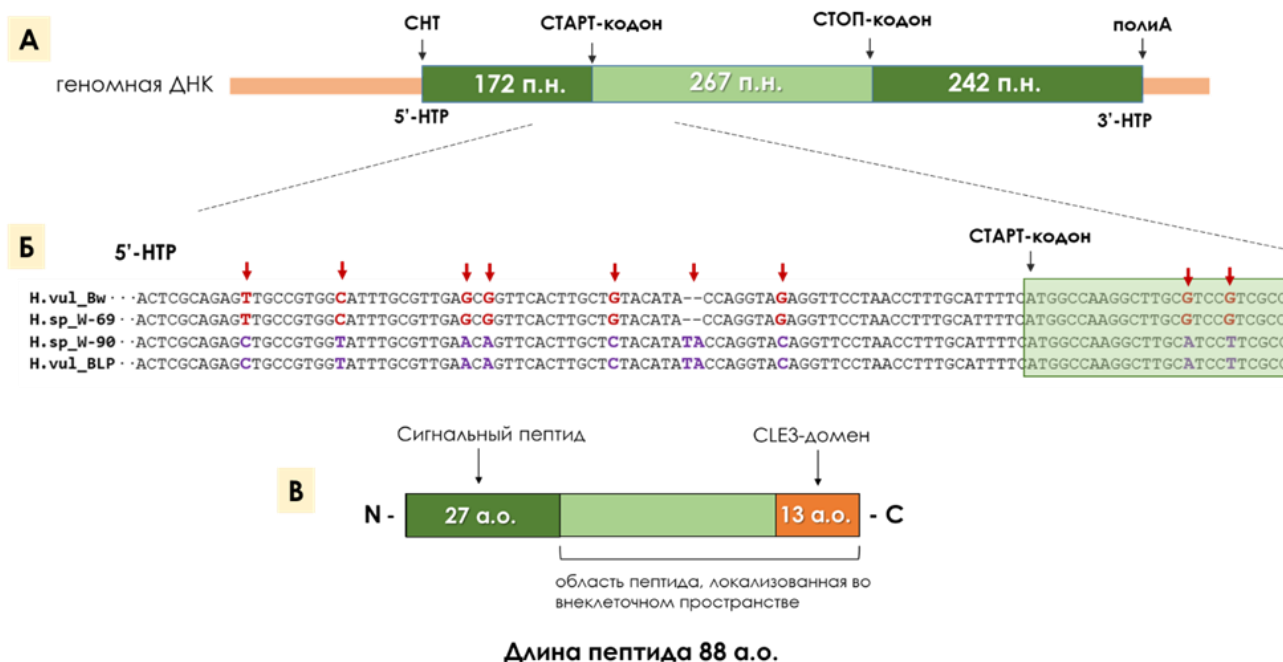
В результате генотипирования для аллелей одного из ПЦР-маркеров была показана наибольшая ассоциация с присутствием меланина. Для маркера к гену *HORVU1Hr1G086780* аллель А был выявлен в 96,61% образцов с неокрашенным

колосом, а аллель В в 100% образцов с черной окраской. Таким образом, было выдвинуто предположение, что ген *HORVU1Hr1G086780* является геном-кандидатом на роль *Vrp1*.

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 1). 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). Более того, в некоторых исследованиях были выдвинуты предположения о возможных плейотропных функциях сигнальных пептидов CLE, включая влияние на метаболизм фенилпропаноидов (Strabala et al., 2006, 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 проанализирована при помощи секвенирования в образцах ячменя, 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 1). 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 различиями в аминокислотной последовательности гена, либо с полиморфизмами в 5'-нетранслируемой области. Вероятно, выявленные полиморфизмы в нетранслируемой области мРНК могут влиять на её пространственную структуру и эффективность связывания с рибосомой в процессе трансляции. Было показано, что один из вариантов описанного гаплотипа, встречается у всех проанализированных образцов ячменя с меланином, а второй вариант – был выявлен только среди образцов без меланина (Рисунок 1). Это наблюдение позволяет предположить, что гаплотип, ассоциированный с черной окраской зерновки, имеет монофилетическое происхождение и вероятно возник до доместикации ячменя.

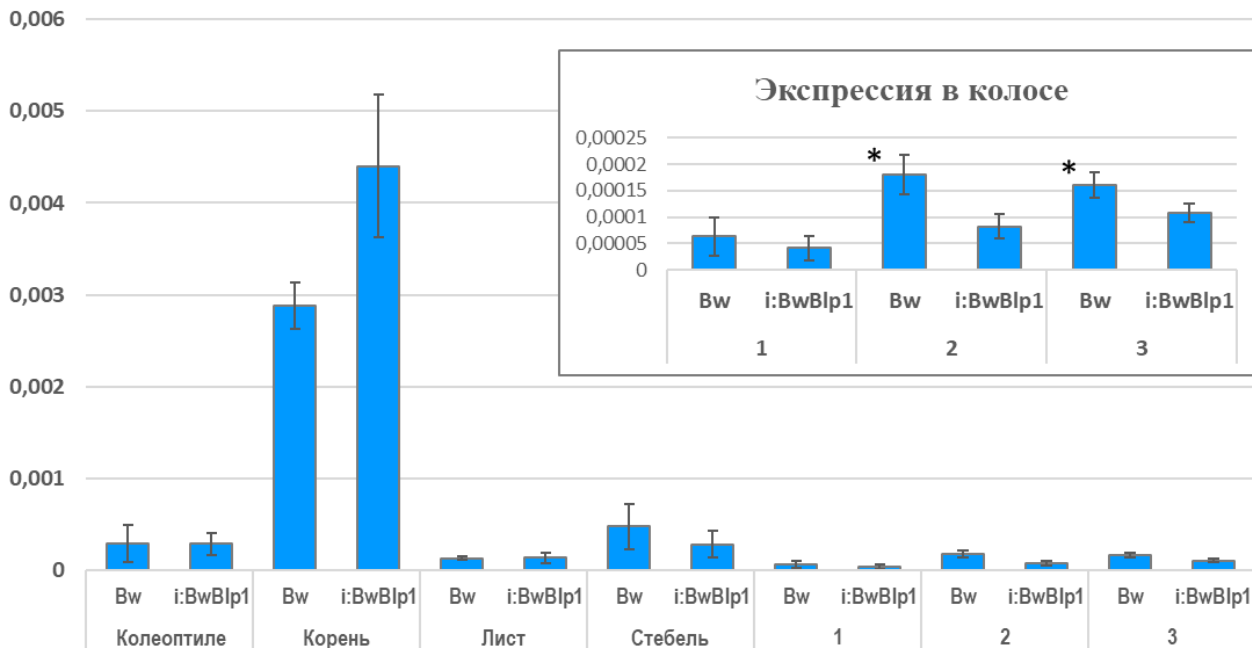




**Рисунок 1. (А)** Структура гена HORVU1Hr1G086780. СНТ – сайт начала транскрипции, полиА – сайт полиаденилирования, 5'- и 3'- НТР – 5'- и 3'-нетранслируемые районы. **(Б)** Фрагмент нуклеотидной последовательности гена HORVU1Hr1G086780, секвенированной в двух генотипах ячменя *H.vulgare*: Bw – Bowman (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.

Был проведен сравнительный анализ транскрипционной активности гена HORVU1Hr1G086780 в почти-изогенной линии *i:BwBlp1* и родительском сорте Bowman в колеоптиле 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 2). В колосе наблюдаемая экспрессия данного гена оказалась примерно на порядок ниже, чем в корнях, однако, можно отметить значимые отличия уровня экспрессии между Bowman и *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

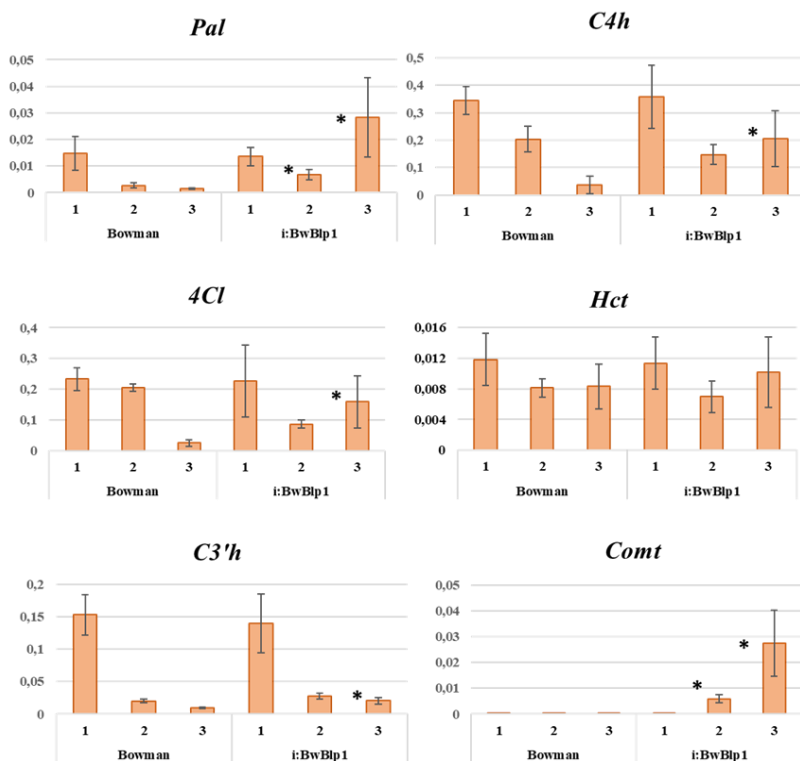


**Рисунок 2.** Относительный уровень экспрессии гена HORVU1Hr1G086780 в различных органах ячменя. 1 – развивающийся колос на стадии выхода в трубку, 2 – стадия молочно-восковой спелости зерна, 3 – стадия ранней восковой спелости зерна. Планки погрешности отражают стандартное отклонение. \* - отличия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

### *Сравнительный анализ экспрессии генов 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. 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; Wang et al., 2020).

В рамках данной работы был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза фенилпропаноидов – *Pal* (фенилаланин-аммиак-лиаза), *C4h* (циннамат-4-гидроксилаза) и *4Cl* (4-кумарат-КоА лигаза), а также генов *Hct* (гидроксицинамоил-КоА трансфераза), *C3`h* (шикимат-3`-гидроксилаза) и *Comt* (O-метилтрансфераза кофейной кислоты), кодирующих ферменты, участвующие в синтезе монолигнолов, в почти-изогенных линиях ячменя в динамике развития колоса (Рисунок 3). Было показано, что в развивающемся колосе на стадии выхода в трубку происходит активация генов данного метаболического пути вне зависимости от генотипа растения.



**Рисунок 3.** 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-тест,  $p < 0,05$ ) между линией i:BwBlp1 и Bowman на соответствующей стадии развития.

Однако, в линии, накапливающей меланин в оболочках зерновки – i:BwBlp1, 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.

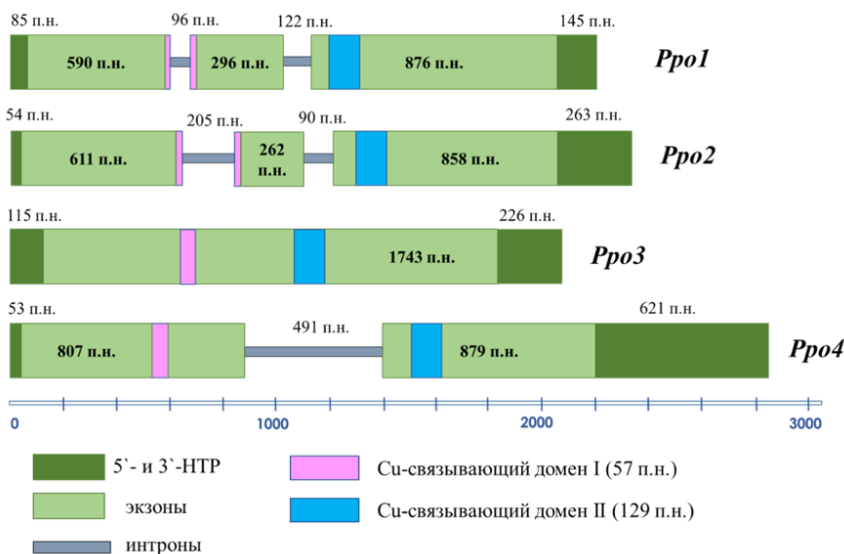
Более того, в данном исследовании была выявлена специфическая активация экспрессии гена *Comt* в линии с меланином в зерне на молочно-восковой и ранней восковой стадиях спелости (Рисунок 3). Данный фермент в процессе биосинтеза монолигнолов может осуществлять несколько реакций, в результате которых могут 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).

### **Анализ семейства генов полифенолоксидаз (*Ppo*) ячменя и проверка их роли в синтезе меланина**

Известно, что меланины образуются в результате окисления и полимеризации фенольных предшественников при участии фермента полифенолоксидазы (PPO) при механическом повреждении растительных клеток (Nicolas et al., 1994). Однако, в последнее время в литературе появляются данные о возможных функциях PPO в неповрежденных растениях, в том числе участие в генетически детерминированном синтезе меланина в оболочках семян растений (Wan et al., 2016, Li et al., 2020, Wang et al., 2020). Поэтому одной из задач данной работы стало изучение семейства генов *Ppo* ячменя, включая установление роли в синтезе меланина.

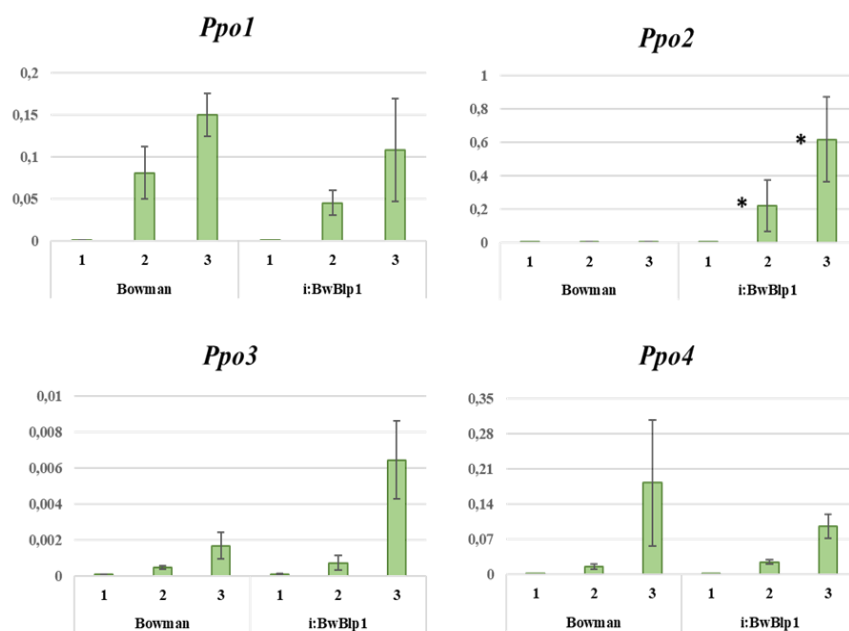
На основании известных последовательностей генов *Ppo1* (NCBI: AB549330) и *Ppo2* (NCBI: AB549331) с использованием алгоритма BLAST в базе данных EnsemblPlants по гомологии с консервативным тирозиназным доменом в геноме ячменя были идентифицированы два дополнительных гена, кодирующих полифенолоксидазу: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



**Рисунок 4.** 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.

115 п.н. и 226 п.н., соответственно. В структуре гена *Ppo3* не было обнаружено интронов. 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 4), кодирующие пептид длиной 562 а.о. Из сравнения структурной организации генов семейства полифенолоксидаз 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. Несмотря на различия в структуре генов *Ppo*, а также их высокую вариабельность внутри семейства, все четыре гена обладают функциональным тирозиназным доменом, включающим два консервативных Cu-связывающих мотива. 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.

Для проверки транскрипционной активности генов *Ppo* в колосе ячменя, а также выявления их связи с меланогенезом, был проведен сравнительный анализ экспрессии данных генов в линии *i:BwBlp1* и сорте *Bowman* в динамике развития колоса. Для этого к каждому гену *Ppo* были разработаны специфичные праймеры. Результаты анализа представлены на Рисунке 5.



**Рисунок 5.** 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.

Можно отметить, что все четыре гена *Ppo* являются транскрипционно активными в колосе ячменя, и в отличие от генов пути биосинтеза фенилпропаноидов,

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:WwB1p1*. Таким образом, можно предположить, что один из четырех генов из семейства полифенолоксидаз ячменя, *Ppo2*, участвует в окислении фенольных субстратов в процессе синтеза 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:WwB1p1*, несущей доминантные гены *Ppo1*, *Ppo2* и *B1p1*. 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* (Taketa et al., 2010). При скрещивании данных линий с *i:WwB1p1* были получены две популяции  $F_2$ : I677 x *i:WwB1p1* (202 растения), U004 x *i:WwB1p1* (124 растения). В поколении  $F_1$  для всех растений, полученных в результате скрещиваний, наблюдалась черная окраска цветковых чешуй и перикарпа как в *i:WwB1p1*. В поколении  $F_2$ , полученном в результате скрещивания с линией U004, наблюдались два фенотипических класса, соответствующих фенотипам родительских форм, 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 *B1p1* было показано, что присутствие меланина в зерновке зависит только от аллельного состояния гена *B1p1* и не зависит от аллелей гена *Ppo1*.

В поколении  $F_2$ , полученном в результате скрещивания *i:WwB1p1* с линией I677, несущей рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2*, было выявлено три фенотипических класса: черная окраска зерновки, соответствующая фенотипу *i:WwB1p1* 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. Черный, серый и белый фенотипические классы были представлены в соотношении 9:3:4 ( $\chi^2 = 1,547$ , p-value = 0,461). В результате генотипирования данных растений при помощи ПЦР-маркеров к генам *B1p1* 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 *B1p1* в гомозиготе или гетерозиготе. Причем, все растения с черным пигментом в зерновке имели доминантный аллель *B1p1*, и ни одно из растений, несущих доминантный аллель *B1p1* и рецессивный аллель *Ppo2*

не характеризовались полным отсутствием меланина. Таким образом, можно предположить наличие эпистатического взаимодействия между генами *Blp1* и *Ppo2*: ген *Ppo2* оказывает влияние на синтез меланина в зерновке ячменя, однако, его присутствие не является необходимым.

U004 x i:Bw <i>Blp1</i> 124 растения		I677 x i:Bw <i>Blp1</i> 200 растений	
<b><i>Blp1Ppo1</i></b> 68 растений черные	<b><i>blp1 Ppo1</i></b> 26 растений белые	<b><i>Blp1 Ppo2</i></b> 118 растений 111 - черные 7 - серые	<b><i>blp1 Ppo2</i></b> 42 растения все белые
<b><i>Blp1 ppo1</i></b> 21 растение черные	<b><i>blp1 ppo1</i></b> 9 растений белые	<b><i>Blp1 ppo2</i></b> 30 растений 6 - черные 24 - серые	<b><i>blp1 ppo2</i></b> 10 растений все белые

**Рисунок 6.** Сопоставление результатов фенотипирования и генотипирования растений по генам *Ppo1*, *Ppo2*, *Blp1* в поколении F<sub>2</sub> скрещиваний U004 x i:Bw*Blp1* и I677 x i:Bw*Blp1*. Для двух растений из популяции I677 x i:Bw*Blp1* аллель гена *Ppo2* не был определен.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Меланины растений являются малоизученной группой пигментов фенольной природы, которые окрашивают оболочки семян растений в черный или коричневый цвет. Реакция ферментативного потемнения (enzymatic browning reaction), в результате которой происходит 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 F<sub>2</sub>, полученных в результате скрещиваний линий, несущих рецессивные аллели генов *Ppo1* и *Ppo2*, с линией i:Vw*Blp1* было установлено наличие эпистатического взаимодействия между генами *Blp1* 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 синтез меланина. Полученные результаты станут основой для дальнейшего изучения механизмов синтеза меланина у растений. Разработанные ПЦР-маркеры к гену *Blp1* 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 *Blp1*, 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 *Blp1*;
4. Выделены и охарактеризованы два новых гена семейства полифенолоксидаз ячменя – *Pro3* и *Pro4*, а также показано участие гена *Pro2* в синтезе меланина в зерновке ячменя.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### 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. – Vol. 12. – I. 1. – P. 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. – Vol. 11. – I. 770. DOI: 10.3389/fpls.2020.00770

### Публикации в материалах научных конференций:

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 Пушинская 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.