

ГОРДЕЕВА ЕЛЕНА ИВАНОВНА

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

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск

2014

Работа выполнена в секторе функциональной генетики злаков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный руководитель: доктор биологических наук
Хлесткина Елена Константиновна

Официальные оппоненты: **Агафонов Александр Викторович**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск

Стёпочкин Петр Иванович
доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий лабораторией отдаленных гибридов зерновых культур. ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции Россельхозакадемии, п. Краснообск Новосибирской области

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «___» _____ 201_ г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

У наиболее распространенной злаковой культуры - мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) зерно может быть неокрашенным, либо имеет красновато-коричневый, голубовато-серый или фиолетовый оттенок. Различия по окраске обусловлены накоплением определенных флавоноидных пигментов в разных слоях оболочки зерна пшеницы. Синтез проантоцианидинов в семенной оболочке приводит к появлению красновато-коричневого оттенка (признак «красное зерно» - «red grain») и контролируется генами *R*, локализованными в третьей гомеологической группе хромосом пшеницы. Голубовато-серый оттенок появляется вследствие синтеза антоцианов в алейроновом слое (признак «голубой алейрон» - «blue aleurone») и регулируется генами *Va*, привнесенными в геном мягкой пшеницы от дикорастущих сородичей за счет транслокаций в хромосомах четвертой гомеологической группы. Фиолетовая окраска обусловлена синтезом антоцианов в клетках перикарпа (признак «фиолетовый перикарп» - «purple pericarp»). Этот признак регулируется двумя комплементарными доминантными генами: *Pp-D1* (хромосома 7D) и *Pp3* (хромосома 2A) (Zeven, 1991; McIntosh et al., 2008, 2013).

Включение в селекционный процесс генов, контролирующих биосинтез антоцианов в перикарпе зерна, может в конечном счете повысить питательную ценность производимых цельнозерновых продуктов. Направленное введение целевых генов при селекции сортов пшеницы требует знаний о механизмах генетической

регуляции и структурно-функциональной организации, а также о локализации отдельных генов, участвующих в формировании целевого признака. В связи с этим изучение функциональной организации новых и уже известных генов, контролирующей фиолетовую окраску перикарпа, является актуальной задачей. Для установления функциональной роли отдельных генов *Pp* путем сравнительного анализа активности генов биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна наиболее подходящей моделью являются почти изогенные линии, несущие разные комбинации доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp*.

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

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

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

Теоретическая и практическая ценность работы. Линии, полученные в работе, а также результаты их генотипирования и анализа транскрипции генов *Chi*, *F3h* и *TaMyc1* в перикарпе данных линий представляют значимость для дальнейших

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

Положения, выносимые на защиту.

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

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 10 российских и международных конференциях, среди которых: III Международная конференция "Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution" (2010, Алушта), Международная Конференция "Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology" (2010, Новосибирск; 2012, Иркутск), 2-ая Международная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (2011, Москва, Звенигород), 15-ая международная конференция Европейского сообщества по анеуплоидам пшеницы EWAC (2011, Нови Сад, Сербия), 12-й Международный симпозиум по генетике пшеницы (2013, Йокогама, Япония), Международный симпозиум по генетике и селекции твердых пшениц (2013, Рим, Италия), Конференция ВОГиС «Проблемы генетики и селекции» (2013, Новосибирск), Международная научно-практическая конференция «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (2013, Новосибирск), VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы (2014, Ростов-на-Дону).

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

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на

121 страницах печатного текста, включая 8 таблиц и 15 рисунков. Список цитированной литературы содержит 240 работ.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генотипы используемых в работе изогенных линий, в том числе линий, полученных в настоящей работе, описаны в таблице 1. Растения выращивались в парнике и в гидропонной теплице центра коллективного пользования лаборатории искусственного выращивания растений ИЦиГ СО РАН. Рекуррентным родителем служил яровой сорт мягкой пшеницы Саратовская 29. Донором рецессивного аллеля *pp-A1* исходно являлся сорт *T. aestivum* Yanetzki Probat (YP). В настоящей работе в качестве донора *pp-A1* использовалась линия S29/YP 140, выбранная из серии рекомбинантных линий, полученных ранее; ее геном идентичен С29 за исключением короткого фрагмента от YP в хромосоме 7A (Khlestkina et al., 2010). Донорами доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* исходно служили сорта *T. aestivum* Purple и Purple Feed, а в настоящей работе были использованы их производные: линии *i:S29Pp1Pp2^{PF}* и *i:S29Pp1Pp3^P* (Arbuzova et al., 1998; Tereshchenko et al., 2012). Для проверки возможности использования вновь созданных линий в качестве тестерных на присутствие доминантных аллелей генов *Pp* использовалась линия с неизвестным аллельным состоянием генов *Pp*, *i:S29Ra*, полученная ранее отбором по признаку окраски ушек листового влагалища (Arbuzova et al., 1998).

В первой серии скрещиваний было произведено беккроссирование каждой из линий *i:S29Pp1Pp2^{PF}* (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}*) и *i:S29Pp1Pp3^P* (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*) родительской формой Саратовская 29 (схема на примере *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* приведена на рис. 1). Во второй серии экспериментов проводилось скрещивание полученных линий *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}* с линией S29/YP 140 (*i:S29pp-A1pp-D1pp3*) (схема на примере *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}* приведена на рис. 2).

В каждой серии скрещиваний для отбора растений F₂, имеющих нужный генотип, использовался комбинированный подход с применением молекулярных (микросателлитных) и фенотипических («окраска перикарпа» и «окраска колеоптиле») маркеров. Возможность использования *Rc* (red coleoptile – красное колеоптиле) в качестве маркера для отбора линий с нужным аллелем *Pp* показана в настоящей работе.

Характеристика F₂ популяций пшеницы, используемых в работе для проведения тестов на аллелизм между линиями и сортами, имеющими окраску колеоптиле, дана в таблице 2. Окраску перикарпа зерна у растений поколения F₁ и F₂ от каждого скрещивания оценивали визуально дважды: во время созревания семян и после сбора урожая. Окраска колеоптиле оценивалась согласно методу, описанному ранее (Khlestkina et al., 2011). Определение участков интрогрессии с различными аллельными состояниями генов антоциановой окраски перикарпа зерна осуществляли с помощью микросателлитных маркеров, локализованных в хромосомах 2A, 7A и 7D пшеницы (рис. 1, 2). ДНК экстрагировали из листьев растений в соответствии с процедурой модифицированного протокола Plaschke et al. (1995). Анализ микросателлитных маркеров проводили согласно протоколу разработчиков (Röder et al. 1998; Ganal, Röder, 2007). Разделение продуктов ПЦР проводили в 5% агарозном геле высокого разрешения “Hy AgaroseTM” (Hydragene Co., Ltd).

Таблица 1. Набор изогенных линий с разными комбинациями доминантных (Д) и рецессивных (Р) аллелей генов *Pp*.

Обозначение (предыдущее/ альтернативное название)	<i>Pp-A1</i> (7A)	<i>Pp-D1</i> (7D)	<i>Pp3</i> (2A)	Антоциановая пигментация перикарпа	Антоциановая пигментация колеоптиле (доминантные гены)
*i:S29<i>Pp-A1Pp-D1Pp3</i>^{PF} (i:S29 <i>Pp1Pp2PF</i>)	Д	Д	Д	интенсивная	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)
*i:S29<i>Pp-A1pp-D1Pp3</i>^{PF}	Д	Р	Д	слабая	слабая (<i>Rc-A1</i>)
*i:S29<i>Pp-A1Pp-D1pp3</i>^{PF}	Д	Д	Р	отсутствует	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)
i:S29<i>pp-A1pp-D1Pp3</i>^{PF}	Р	Р	Д	отсутствует	отсутствует
*i:S29<i>Pp-A1pp-D1pp3</i> (Саратовская 29)	Д	Р	Р	отсутствует	слабая (<i>Rc-A1</i>)
*i:S29<i>pp-A1pp-D1pp3</i> (S29/YP 140)	Р	Р	Р	отсутствует	отсутствует
*i:S29<i>Pp-A1Pp-D1Pp3</i>^P (i:S29 <i>Pp1Pp3P</i>)	Д	Д	Д	интенсивная	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)
*i:S29<i>Pp-A1pp-D1Pp3</i>^P	Д	Р	Д	слабая	слабая (<i>Rc-A1</i>)
*i:S29<i>Pp-A1Pp-D1pp3</i>^P	Д	Д	Р	отсутствует	интенсивная (<i>Rc-A1+Rc-D1</i>)
i:S29<i>pp-A1pp-D1Pp3</i>^P	Р	Р	Д	отсутствует	отсутствует

* - отмечены линии, используемые для анализа экспрессии генов биосинтеза антоцианов в перикарпе. «^P» – источник доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* сорт Purple. «^{PF}» - источник доминантных аллелей *Pp3* и *Pp-D1* сорт Purple Feed.

Выделение и очистку суммарной РНК из перикарпа семян молочной спелости проводили с использованием набора реагентов «Zymo Research Plant RNA MiniPrep™ kit» (www.zymoresearch.com) и «RNase-free DNase set» (Qiagen). Одноцепочечную кДНК синтезировали из 0,7 мкг суммарной РНК с использованием праймера (dT)₁₅ и набора реагентов «Fermentas RevertAid Transcription kit» (www.thermoscientificbio.com/fermentas). Все процедуры выполнялись согласно протоколам, прилагаемым к используемым наборам. Для ОТ-ПЦР использовали праймеры, разработанные в секторе функциональной генетики злаков ИЦиГ СО РАН. Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени проводилась на кДНК в реакционной смеси, содержащей 1 пмоль прямого и обратного праймеров, амплифицирующих фрагменты генов *Chi* (*Chi-1*) или *F3h* (*F3h-1*), или 3,5 пмоль праймеров для *TaMyc1*, при использовании набора реагентов «Синтол SYBR Green I» (<http://www.syntol.ru/productmix.htm>) в системе «ABI Prism 7000 Sequence Detection System» (www.lifetechnologies.com). Анализ данных ОТ-ПЦР проводили при использовании программы SDS1.2.3. методом порогового сравнения графиков накопления ДНК (Ct) с определением эффективности ПЦР по последовательным разбавлениям образца. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводили анализ транскрипции гена *Ubc*.

Таблица 2. Характеристика используемых в работе F₂ популяций *T. aestivum*.

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

Антоцианы выделяли экстракцией в 1%-м растворе HCl в метаноле из измельченных зерен изогенных линий пшеницы согласно методике Christie et al. (1994) с модификациями. Содержание антоцианов измеряли на спектрофотометре «SmartSpec™Plus» (BioRad) при длине волны 530 нм.

Генетическое расстояние между локусами *Pp*, *Rc* и ДНК-маркерами вычисляли с помощью программы MAPMAKER 2.0 (Lander et al., 1987). Оценка достоверности различий между средними значениями оценивалась с помощью статистического критерия Манна-Уитни (*U*-test) (Васильева, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Маркер-контролируемое получение растений с заданным генотипом. Для генотипирования пшеницы на сегодняшний день чаще всего применяются микросателлитные (SSR) маркеры (Леонова и др., 2002, 2008; Leonova et al., 2008; Гордеева и др., 2009; Леонова, 2013; Timonova et al., 2013), которые отличаются относительно частой и равномерной встречаемостью в геноме, а также высоким уровнем полиморфизма (Хлесткина и Салина, 2006).

В настоящей работе осуществлено получение линий пшеницы с разным сочетанием доминантных и рецессивных аллелей комплементарных генов *Pp*. При этом для ускорения процесса создания необходимых линий использовался комбинированный подход с применением молекулярных и фенотипических маркеров. В нашем исследовании установлено, что ген *Rc-D1* располагается на расстоянии 2,5 сМ от гена *Pp-D1* в коротком плече хромосомы 7DS (Tereshchenko et al., 2012), поэтому окраска колеоптиле использовалась как маркер для отбора проростков растений поколения F₂ на присутствие доминантных и рецессивных аллелей гена *Pp-D1* с целью дальнейшего создания линий *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}* и *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}* соответственно (Гордеева и др., 2014). Это существенно сократило количество высеваемых растений, из которых выделялась ДНК для последующего микросателлитного анализа. Для отбора по гену *Pp-D1* использовались фланкирующие данный ген микросателлитные маркеры (рис. 1). Из их числа маркеры *Xgwm0044*, *Xgwm0111*, *Xgwm0437*, аллели которых наиболее четко амплифицируются и различаются по длине в 5% агарозном геле высокого разрешения (см. пример на рисунке 3а), могут быть рекомендованы для использования в дальнейшем селекционном процессе, направленном на введение гена *Pp-D1* в различные сорта пшеницы (Гордеева и др., 2014). Для селекции по гену *Pp3* также использовались фланкирующие данный ген микросателлитные маркеры. Из их числа *Xgwm4204*, *Xgwm0817*, *Xgwm0445*, *Xgwm0312* (см. примеры на рисунке 3б) могут быть рекомендованы для использования в дальнейшем при отборе генотипов, содержащих ген *Pp3* (Гордеева и др., 2014).

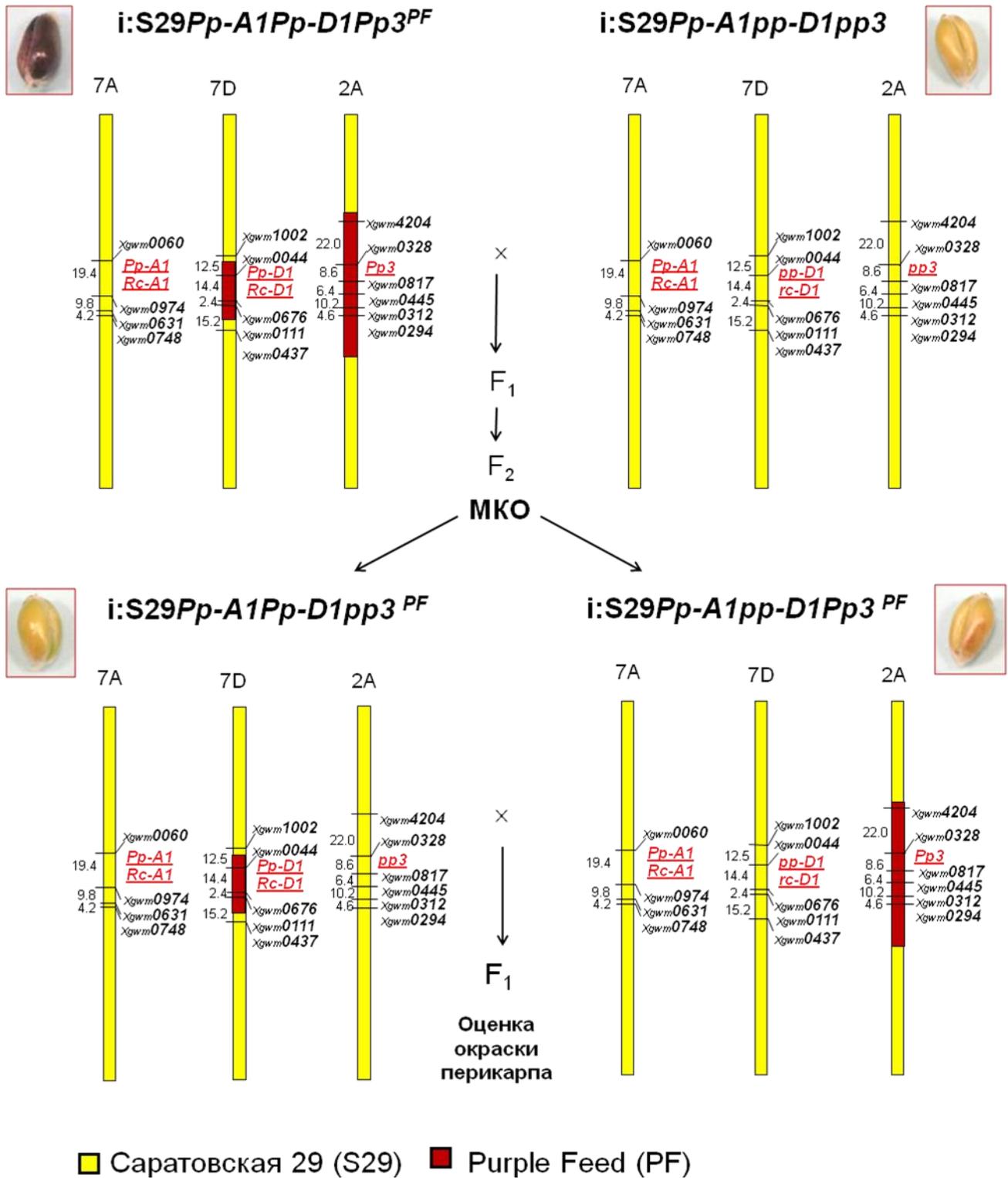


Рис. 1. Первая серия скрещиваний, направленная на получение и верификацию изогенных линий, различающихся аллельным составом в локусах *Pp-D1* и *Pp3*. МКО – маркер-контролируемый отбор.

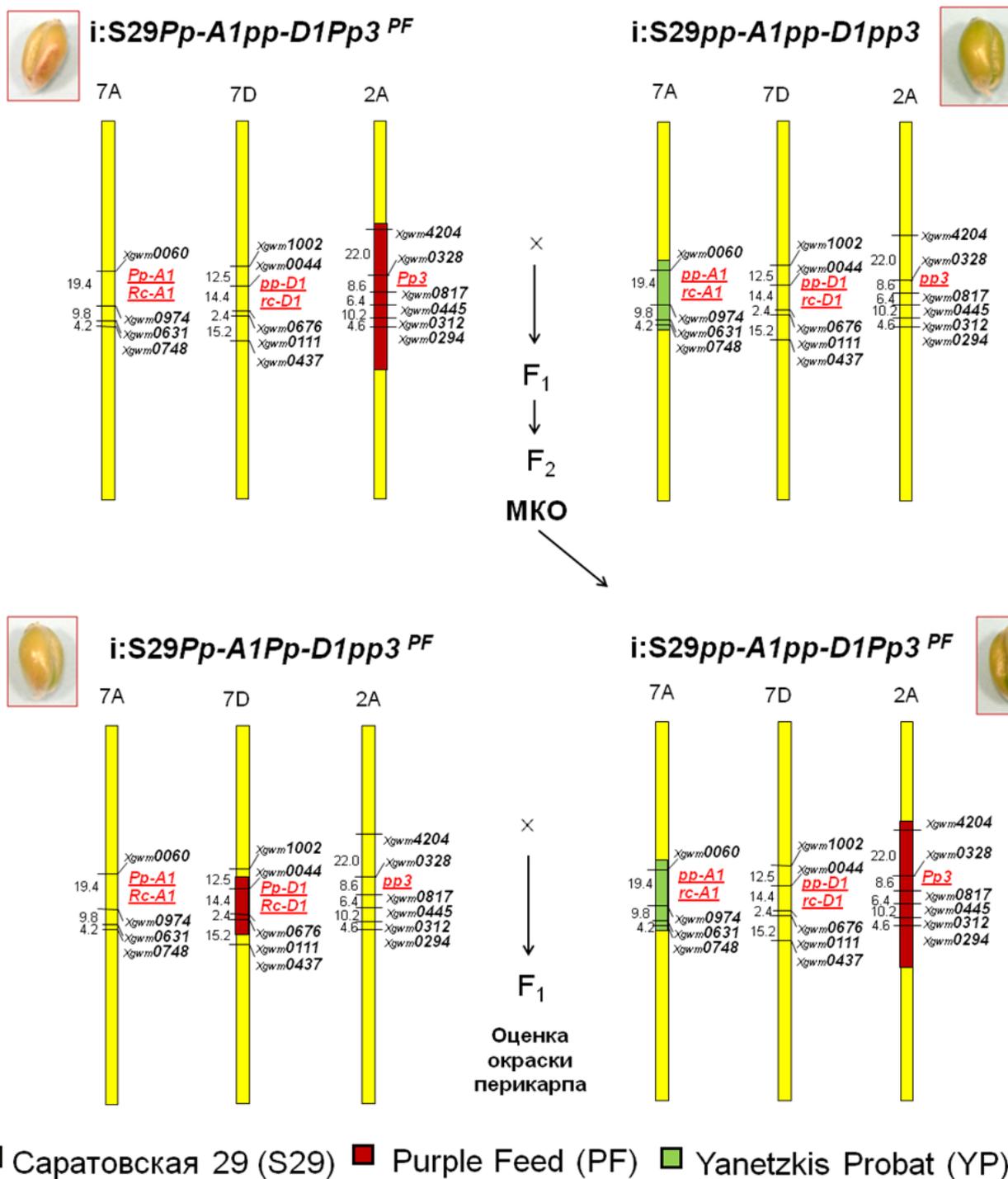


Рис.2. Вторая серия скрещиваний, направленная на доказательство существования гена *Pp-A1*, а также на получение и верификацию изогенных линий, различающихся аллельным составом в локусе *Pp-A1*. МКО – маркер-контролируемый отбор.

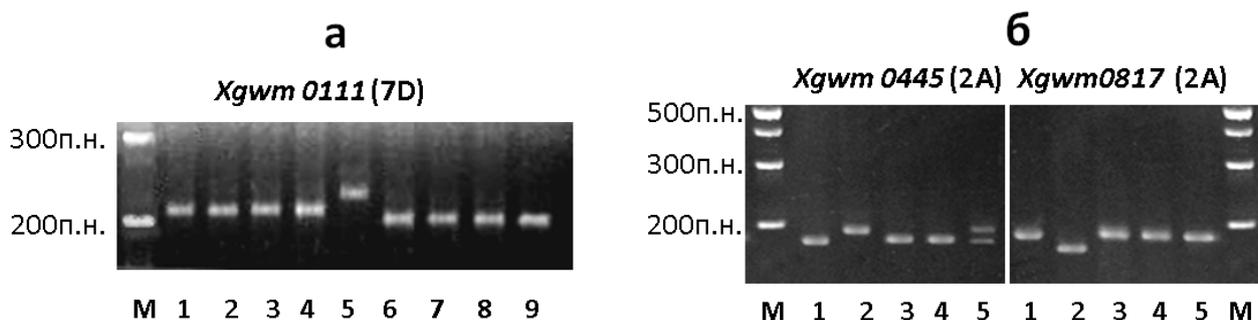


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к микросателлитным локусам: (а) *Xgwm0111* на ДНК Саратовской 29 (дорожка 5), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (4), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (6), а также F₂ растений *C29×i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (1-3) и *C29×i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (7-9); (б) *Xgwm0445* и *Xgwm0817* на ДНК Саратовской 29 (дорожка 1), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (2) и F₂ растений *C29×i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (3-5). М – маркер длины фрагментов ДНК.

Для отбора по гену *Pp-A1* использовались микросателлитные маркеры хромосомы 7A (рис. 2). Из их числа маркеры *Xgwm0060*, *Xgwm0631*, *Xgwm0748*, аллели которых наиболее четко амплифицируются и различаются по длине в 5% агарозном геле высокого разрешения, могут быть рекомендованы для использования в дальнейшем селекционном процессе.

В итоге после двух серий скрещиваний (рис. 1 и 2) и отбора растений с помощью маркеров в настоящей работе создано 6 новых линий: *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF}*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^{PF}*, *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P*, *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P*, *i:S29pp-A1pp-D1Pp3^P*, а также уточнен генотип (в локусе *Pp-A1*) четырех линий, использовавшихся в скрещиваниях в качестве родительских: *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}* (*i:S29Pp1Pp2^{PF}*), *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* (*i:S29Pp1Pp3^P*), *i:S29Pp-A1pp-D1pp3* (Саратовская 29), *i:S29pp-A1pp-D1pp3* (S29/YP 140) (рис. 2, табл. 1).

Таким образом, при использовании фенотипических и молекулярных маркеров в комбинации с методом гибридизации удалось за три вегетационных периода получить гомозиготные растения с различными комбинациями аллелей *Pp3* и *Pp-D1*, и затем в ходе двух дополнительных вегетаций получить на их основе линии с разными аллелями *Pp-A1*. Подсчет потенциального срока и объема работы, при которых отбор проводился бы без использования микросателлитных маркеров и маркера *Rc*, и сравнение с затраченными в настоящей работе ресурсами позволили сделать вывод о том, что благодаря использованию маркеров процесс создания линий удалось ускорить вдвое, а объем исследуемого растительного материала сократить в 70 раз (Гордеева и др., 2014).

Гомеологичные копии генов *Pp*. К настоящему моменту показано, что большинство генов мягкой пшеницы присутствуют в ее аллогексаплоидном геноме ($2n = 6x = 42$; ВВААDD) в виде гомеологичных копий, ведущих свое происхождение от общего предкового гена (McIntosh et al., 2008), что согласуется с законом гомологических рядов, сформулированным Н.И. Вавиловым (1935).

Ранее в седьмой гомеологической группе хромосом пшеницы было выявлено два гена *Pp*: *Pp-B1* в хромосоме 7BS твердой пшеницы (Khlestkina et al., 2010) и *Pp-D1* в хромосоме 7DS мягкой пшеницы (Tereshchenko et al., 2012). В ходе создания изогенных линий в настоящей работе обнаружено неполное ингибирование биосинтеза антоцианов в перикарпе растений, имеющих генотип *pp-D1pp-D1Pp3Pp3*. Было выдвинуто предположение о наличии в хромосоме 7AS сорта Саратовская 29 гена *Pp-A1* с функцией, аналогичной гомеологам *Pp-B1* и *Pp-D1*, но с более слабой активностью по сравнению с ними. Полученные линии, имеющие генотип *pp-D1pp-D1Pp3Pp3*, скрестили со специально подобранной линией S29/YP 140, где в хромосоме 7A присутствовал фрагмент от неокрашенного сорта YP, фланкируемый микросателлитными маркерами *Xgwm0060* и *Xgwm0748*. В результате отобранные линии, несущие в хромосоме 7A вставку от YP, а в хромосоме 2A вставку от Purple или Purple Feed (сортов-доноров доминантного аллеля *Pp3*), имели неокрашенный перикарп, что послужило доказательством присутствия гена *Pp-A1* в хромосоме 7AS Саратовской 29 в интервале между маркерами *Xgwm0060* и *Xgwm0748*.

Таким образом, три субгенома мягкой пшеницы: А, В и D, – содержат, каждый, гомеологичную копию гена *Pp-1*.

Для гена *Pp3* (хромосома 2A; Dobrovolskaya et al., 2006) гомеологичные копии в хромосомах 2B и 2D пока не выявлены.

Новые изогенные линии как удобная модель для сравнительных исследований и тестирования генетического материала. В настоящей работе показано, что у линий, несущих доминантные аллели *Pp-D1* и *Pp3*, относительный уровень антоцианов в зерне в 53-75 раз выше по сравнению с линиями, в которых хотя бы один из этих генов находится в рецессивном состоянии. С учетом известных данных о роли антоциановых соединений в противодействии засухе, холоду и другим экстремальным условиям, а также об антимикробном действии данных соединений (Chalker-Scott, 1999; Gordeeva et al., 2013; Khlestkina, 2013), и ввиду наблюдаемого существенного повышения содержания антоцианов в зерне $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}$ целесообразно дальнейшее сравнительное исследование линий $i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF/P}$, $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ в различных стрессовых условиях.

Кроме того, линии $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF/P}$ и $i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^{PF/P}$ могут использоваться для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов Pp в других линиях и сортах. В настоящей работе линия $i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$ использовалась в качестве тестерной для скрещивания с линией $i:S29Ra$.

Проверка окраски колеоптиле и перикарпа показала, что $i:S29Ra$ имеет интенсивно окрашенное колеоптиле и неокрашенный перикарп. Тест на аллелизм ($i:S29Ra \times$ Новосибирская 67; табл. 2) показал, что ген Rc линии $i:S29Ra$ аллелен гену Rc сорта Новосибирская 67, то есть $i:S29Ra$ несет доминантный ген $Rc-D1$ (Khlestkina et al., 2014). Наличие этого гена заставило предположить, что по аналогии с Purple Feed и Purple в хромосоме 7D линии $i:S29Ra$ ген $Rc-D1$ может быть сцеплен с $Pp-D1$. Для проверки этого предположения было проведено скрещивание линии $i:S29Ra$ с одной из вновь созданных линий ($i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^{PF}$), несущих рецессивный $pp-D1$, но доминантный комплементарный ген $Pp3$. Все растения в поколении F_1 от этого скрещивания имели интенсивную антоциановую пигментацию перикарпа. Данный результат подтвердил предположение о том, что линия $i:S29Ra$ имеет доминантный аллель $Pp-D1$.

Особенности регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе. В настоящей работе при использовании кДНК перикарпа вновь созданных и родительских линий (табл. 1), несущих различные комбинации аллелей Pp , с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени был проанализирован уровень мРНК структурных генов Chi и $F3h$, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза антоцианов халконфлаванонизомеразу и флаванон-3-гидроксилазу соответственно (рис. 4; Гордеева и др., 2014).

Установлено, что наиболее высокий уровень экспрессии гена Chi наблюдается в присутствии трех доминантных аллелей $Pp-A1$, $Pp-D1$ и $Pp3$ (рис. 4). Однако каждый из этих трех генов по отдельности способен активировать экспрессию гена Chi в перикарпе. Его экспрессия наблюдается даже у растений, рецессивных по всем трем регуляторным генам Pp , что может объясняться участием фермента СНІ в биосинтезе нескольких классов флавоноидных соединений, не только антоцианов.

Для активации экспрессии гена $F3h$ решающее значение имеет одновременное присутствие двух комплементарных генов $Pp-D1$ и $Pp3$ в доминантном состоянии. Если хотя бы один из этих генов присутствует в рецессивном состоянии, уровень экспрессии гена $F3h$ падает до критического (рис. 4), а процесс биосинтеза антоцианов в перикарпе прерывается.

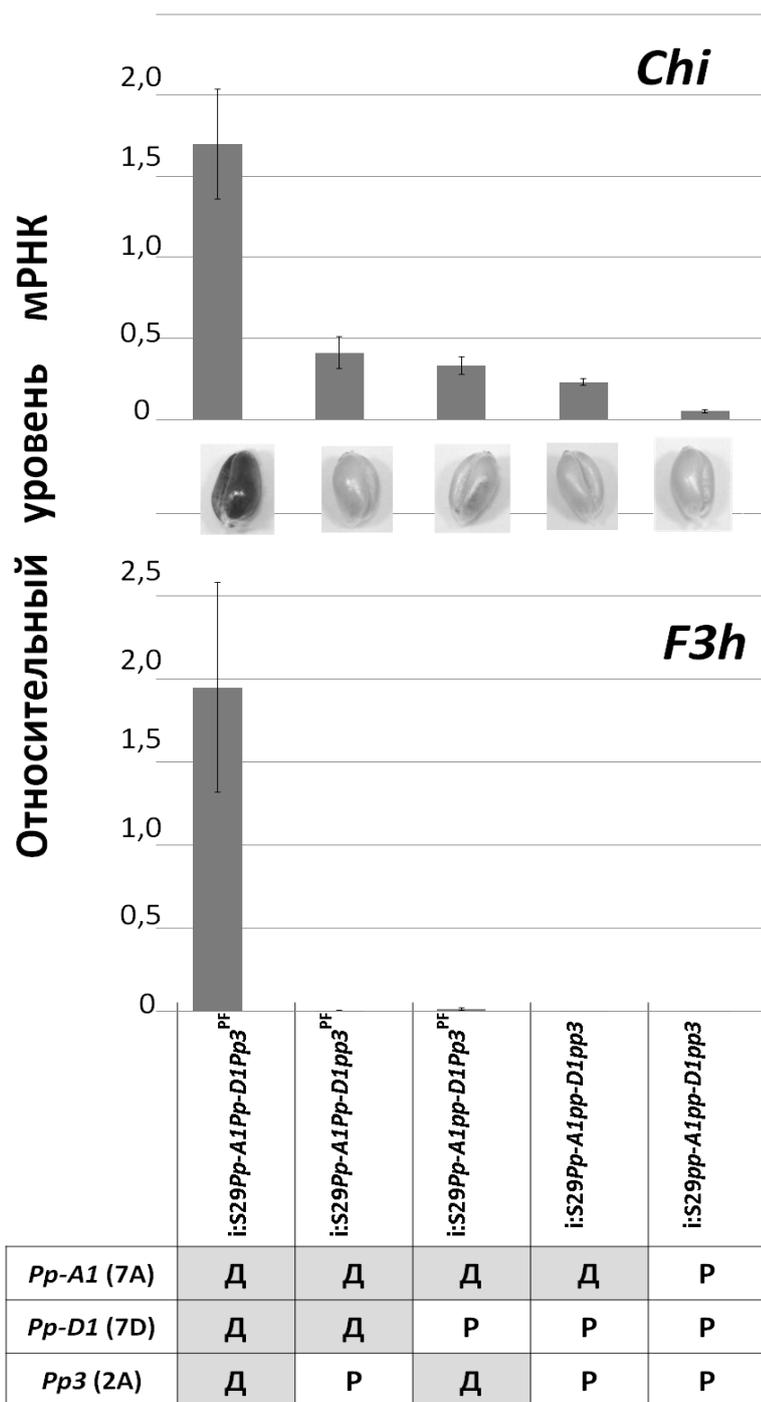


Рис. 4. Экспрессия генов *Chi* (вверху) и *F3h* (внизу) в перикарпе зерна молочной спелости в наборе изогенных линий пшеницы, полученных от исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^{PF}*. Д/Р – доминантный/рецессивный аллель соответствующего гена.

Ранее было выдвинуто предположение о том, что ген *Pp3* кодирует MYC-подобный, а *Pp-1* – MYB-подобный фактор активации транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Хлесткина, 2012). У однодольных растений совместное действие транскрипционных факторов MYC и MYB требуется для активации всех генов биосинтеза антоцианов (Petroni and Tonelli, 2011). Пшеница также относится к однодольным, однако мы видим, что для экспрессии генов биосинтеза антоцианов в перикарпе требуется комплекс MYC+MYB только в случае гена *F3h*, тогда как ген *Chi* экспрессируется при различных комбинациях рецессивных и доминантных аллелей генов *Pp*, кодирующих транскрипционные факторы MYC и MYB (рис. 4; Гордеева и др., 2014). Таким образом, особенности регуляции биосинтеза антоцианов у растений сводятся, вероятно, к существенной вариации регуляторных сетей данного метаболического пути у разных видов.

Недавно из генома мягкой пшеницы была выделена и охарактеризована нуклеотидная последовательность гена *TaMyс1*, который предполагался в качестве гена-функционального кандидата для *Pp3* (Khlestkina et al., 2013). С использованием полученного в настоящей работе набора изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, была изучена экспрессия гена *TaMyс1* в перикарпе (рис. 5). Установлено, что присутствие доминантного аллеля *Pp3* связано с существенно более высоким уровнем *TaMyс1* по сравнению с сестринскими линиями, несущими рецессивный аллель *pp3* (см. на рис. 5 *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* по сравнению с *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P* и *i:S29Pp-A1pp-D1Pp3^P* по сравнению с *i:S29Pp-A1pp-D1pp3*). Это согласуется с предположением о том, что ген *TaMyс1* – и есть ген *Pp3* на молекулярном уровне. Таким образом, основные функциональные различия между доминантными и рецессивными аллелями гена *Pp3* заключаются в различии уровней их экспрессии.

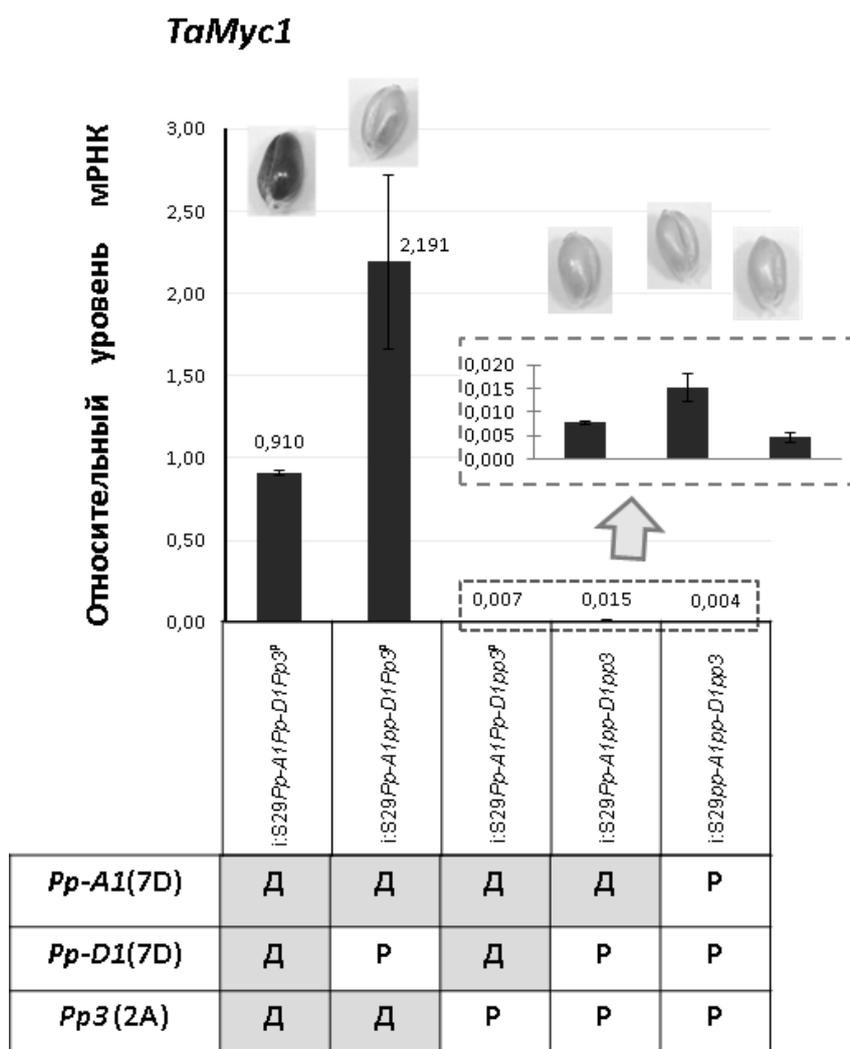


Рис. 5. Экспрессия гена *TaMyс1* в перикарпе зерна молочной спелости в наборе изогенных линий пшеницы, полученных от исходной линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*. Д/Р – доминантный/рецессивный аллель соответствующего гена.

При сравнении, проведенном между сестринскими линиями, отличающимися по доминантным и рецессивным аллелям гена *Pp-D1*, обнаружено, что *TaMyc1* экспрессируется слабее в присутствии доминантного аллеля комплементарного гена *Pp-D1*. Так, уровень мРНК *TaMyc1* в линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* выше, чем в сестринской линии *i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P* в 2,4 раза, в линии *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3* - выше, чем в *i:S29Pp-A1Pp-D1pp3^P* в 2,1 раза (рис. 5). Таким образом, доминантный ген *Pp-D1* частично супрессирует ген *TaMyc1* (*Pp3*).

Несмотря на то, что на модельных видах растений хорошо показано взаимодействие самих белковых факторов MYC и MYB (Mol et al., 1998; Petroni and Tonelli, 2011), о взаимной регуляции генов, кодирующих данные факторы, ранее ничего не было известно. Таким образом, впервые у растений показано, что ген, кодирующий регуляторный MYB-подобный фактор активации структурных генов биосинтеза антоцианов, способен регулировать транскрипцию другого регуляторного гена (кодирующего MYC-подобный фактор).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль флавоноидных соединений в защите растений от различных стрессовых воздействий, а также их положительное влияние на здоровье человека, привлекают все более пристальное внимание исследователей. Особый интерес представляют гены, контролирующие в семенах растений синтез антоциановых пигментов, обладающих высоким антиоксидантным потенциалом.

Настоящая работа внесла вклад в понимание регуляции биосинтеза антоцианов в перикарпе зерна основного хлебного злака – мягкой пшеницы. В данной работе для изучения функциональной роли генов *Pp*, контролирующих фиолетовую окраску зерна, был создан набор изогенных линий, содержащих различные комбинации доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp-D1*, *Pp3*, а также гена *Pp-A1*, впервые описанного в настоящей работе. Использование маркеров существенно ускорило процесс создания желаемых генотипов.

Продемонстрировано, что полученные линии могут использоваться для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp* и для детального анализа механизмов регуляции биосинтеза флавоноидов у пшеницы. В частности, установлено, что между генами *Pp* существует взаимная регуляция.

Набор созданных в настоящей работе линий является перспективной моделью для дальнейших физиологических экспериментов, в том числе направленных на выявление взаимосвязи между синтезом антоцианов в перикарпе и устойчивостью пшеницы к различным факторам биотического и абиотического стресса.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК

- 1) **Гордеева Е.И.**, Леонова И.Н., Калинина Н.П., Салина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 12 – С. 1616–1626.
- 2) Tereshchenko O.Y., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Börner A., Khlestkina E.K. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat // Cereal Research Communications. – 2012. – V. 40. – P. 334–341.
- 3) **Gordeeva E.I.**, Shoeva O.Y., E.K. Khlestkina E.K. Cold stress response of wheat genotypes having different *Rc* alleles // Cereal Research Communications. – 2013. – V. 41. – P.519–526.

- 4) Khlestkina E.K., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line 'i:S29Ra' having intensive anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles // Plant Breeding. – 2014. – V. 133. – P. 454–458.

Статьи в сборниках трудов конференций

- 5) Tereshchenko O.Yu., Khlestkina E.K., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Salina E.A. The genetic basis of anthocyanin biosynthesis in wheat, rye and wheat-rye hybrids under normal and stress conditions // Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution: Abstr. and papers by young scientists of III International Conference dedicated to N.W.Timofeeff-Ressovsky, 9–14 October 2010. – Alushta, 2010. – P.171–174.
- 6) Tereshchenko O.Yu., Khlestkina E.K., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Salina E.A. Relationship between antocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat // EWAC Newsl. – 2012. – V. 15. – P. 72–75.

Тезисы конференций

- 7) Tereshchenko O.Yu., Khlestkina E.K., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Salina E.A. Biosynthesis of flavonoids under salinity stress in *Triticum aestivum* L. // Abstr. Plant genetics, genomics and biotechnology: Proceedings of the international conference. 7–10 June 2010. – Novosibirsk, 2010. – P. 84.
- 8) Tereshchenko O.Yu., Khlestkina E.K., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Salina E.A. Relationship between anthocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat // Abstracts of the 15th EWAC Conference. 7–11 November 2011. – Novi Sad, Serbia, 2011. – P. 26.
- 9) Терещенко О.Ю., **Гордеева Е.И.**, Арбузова В.С., Хлесткина Е.К. Генетические основы и роль в стрессоустойчивости признаков антоциановой окраски у изогенных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях: Тез. II Международной школы-конференции молодых учёных. 5 – 10 декабря 2011. – Москва-Звенигород, 2011. – С. 69.
- 10) Tereshchenko O.Yu., **Gordeeva E.I.**, Arbuzova V.S., Khlestkina E.K. Anthocyanin pigmentation in *Triticum aestivum* L.: genetic basis and role under abiotic stress conditions // Abstr. The 2nd International Conference "Plant Genetics Genomics and Biotechnology". 30 July – 3 August 2012. – Irkutsk, 2012. – P. 70.
- 11) Khlestkina E., Shoeva O., Börner A., **Gordeeva E.** Durum wheat gene for purple grain color: mapping, isolation, functional role and practical value // Abstr. International symposium genetics and breeding of durum wheat. 27–30 May 2013. – Rome, Italy, 2013. – P. 71.
- 12) **Гордеева Е.И.**, Хлесткина Е.К. Создание генетически маркированных линий мягкой пшеницы с различными комбинациями аллелей генов *Pp* (purple pericarp) // Тез. Конференции ВОГИС «Проблемы генетики и селекции». 1–7 июля 2013. – Новосибирск, 2013. – С.20.
- 13) Khlestkina E.K., Shoeva O., **Gordeeva E.I.** MYC-like family of transcription factors in wheat // Abstr. The 12th International Wheat Genetics Symposium. 8-14 September 2013. – Yokohama, Japan, 2013. – P. 6-15.
- 14) **Гордеева Е.И.**, Хлесткина Е.К. Взаимосвязь между накоплением антоцианов в перикарпе зерна пшеницы и реакцией на искусственное старение семян // Материалы конференции "Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине". 1–4 октября 2013. – Новосибирск, 2013 – ч.1. – С.63.
- 15) **Гордеева Е.И.**, Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Маркер-контролируемое получение и использование изогенных линий пшеницы, несущих различные комбинации аллелей *Pp* (Purple pericarp) // Тез. VI Съезд ВОГИС и ассоциированные генетические симпозиумы. 15–20 июня 2014. – Ростов-на-Дону, 2014. – С.149.