

Получение линий мягкой пшеницы с черной окраской зерна путем комбинирования генов, контролирующих фиолетовую окраску перикарпа и голубую окраску алейронового слоя

Чуманова Е.В.^{1*}, м.н.с.; Ефремова Т.Т.¹, к.б.н., с.н.с.; Соболев К.В.², магистрант; Кондратьева И.В.², к.с.-х.н., доцент.

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

*email: chumanova@bionet.nsc.ru

Получены четыре линии сорта Саратовская 29 с черной окраской зерна путем комбинирования генов Pp и Ba1, контролирующих накопление антоцианов в перикарпе и алейроновом слое, характеризующиеся более высоким содержанием антоцианов относительно родительских линий. Использование световой микроскопии и ДНК-маркеров показало присутствие голубого и фиолетового пигментов в соответствующих слоях зерновки и доминантных аллелей генов Ba1, Pp-1 и Pp3 в генотипе изученных линий.

Ключевые слова: мягкая пшеница, антоцианы, голубая, фиолетовая, черная окраска зерна, ДНК-маркеры.

Production of common wheat lines with black grain by combining genes of purple pericarp and blue aleurone

Chumanova E.V.^{1*}, Efremova T.T.¹, Sobolev K.V.², Kondratyeva I.V.²

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk. Russia

*email: chumanova@bionet.nsc.ru

Four lines of the Saratovskaya 29 cultivar with black grain coloration were obtained by combining the genes Pp and Ba1, controlling the accumulation of anthocyanins in the pericarp and aleurone layer, characterized by a higher content of anthocyanins relative to the parental lines. The use of light microscopy and DNA markers showed the presence of blue and violet pigments in the corresponding layers of the grain and Ba1, Pp-1 and Pp3 dominant genes in the genotype of the studied lines.

Key words: common wheat, anthocyanins, blue, purple, black grain, DNA markers.

Окрашенное зерно пшеницы является ценным источником около 700 метаболитов, являющихся биологически активными соединениями (включая фенольные соединения, антоцианы, каротиноиды), обладающих широким спектром биологической активности, а также незаменимых аминокислот, пищевых волокон, витаминов, макро- и микроэлементов [1]. Антоцианы, являясь естественными антиоксидантами,

полезны для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, артритов, различных видов рака, болезни Альцгеймера, сахарного диабета 2 типа и ожирения [2]. Поэтому, весьма актуальны генетические исследования, направленные на получение различных генотипов с окрашенным зерном.

В зависимости от типа и расположения антоцианов в слоях зерновки пшеницы она может иметь голубой, фиолетовый и темно-коричневый (черный) цвет. Биосинтез антоцианов в алейроновом слое зерновки мягкой пшеницы находится под контролем доминантных аллелей генов *Ba* (Blue aleurone), картированных на хромосомах 4 гомеологической группы дикорастущих злаков, в том числе *Ba1*, локализованный в хромосоме 4E *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey. Данные гены интрогрессированы в геном мягкой пшеницы путем получения чужеродных транслокаций в хромосомах четвертой гомеологической группы, замещенных или дополненных линий [1].

Фиолетовая окраска зерна обусловлена синтезом антоцианов в клетках перикарпа и контролируется комплементарным взаимодействием генов *Pp* (Purple pericarp): *Pp-1* (*Pp-A1* в 7AS, *Pp-B1* в 7BS и *Pp-D1* в 7DS) и *Pp3* (хромосома 2A). Признак фиолетовой окраски зерна интрогрессирован в мягкую пшеницу от тетраплоидной пшеницы *Triticum aethiopicum* Jakubz. [3]. Черный цвет зерновки пшеницы является результатом сочетания генов, определяющих фиолетовую окраску перикарпа и голубую окраску алейронового слоя.

Установлено, что пшеница с черным зерном имеет более высокое содержание и более разнообразный состав антоцианов, растворимых и нерастворимых фенольных соединений, чем пшеница с фиолетовой и голубой окраской [4, 5].

Данная работа посвящена получению четырех линий сорта Саратовская 29 (S29) с черной окраской зерна, сочетающих голубую окраску алейронового слоя и фиолетовую окраску перикарпа (рис. 1, а, б). Донором голубой окраски алейронового слоя послужила пшенично-пырейная (*T. aestivum-Th. ponticum*) замещенная линия s:S294Th(4B). В качестве источников фиолетовой окраски перикарпа использовались две изогенные линии сорта S29: i:S29*Pp-D1Pp3^P* и i:S29*Pp-D1Pp3^{PF}* (интрогрессии участков хромосом 7D и 2A от сортов Purple (Австралия) и Purple Feed (Канада) соответственно) [6]. Таким образом, были получены четыре гибридные комбинации: 1 – i:S29*Pp-D1Pp3^P* × s:S294Th(4B) (S29BW1), 2 – s:S294Th(4B) × i:S29*Pp-D1Pp3^P* (S29BW2), 3 – i:S29*Pp-D1Pp3^{PF}* × s:S294Th(4B) (S29BW3), 4 – s:S294Th(4B) × i:S29*Pp-D1Pp3^{PF}* (S29BW4). Во всех гибридных поколениях визуально оценивали окраску зерен отдельно у каждого растения. Для посева каждый раз отбирали растения, имеющие темно-коричневые зерновки. Гомозиготные растения были выделены в поколении F₅.

Проведен анализ конфигурации хромосом в МI мейоза в материнских клетках пыльцы у растений поколения F₄ всех четырех линий. Только у линии BW3 все изу-

ченные растения с черной окраской зерна оказались дисомными и имели 21 бивалент ($2n = 42$). У остальных трех линий около 80–90 % изученных растений имели 21 бивалент; наряду с ними встречались растения с потерей одной хромосомы или плеча и моносомные и дисомные дополненные растения. В дальнейшей работе использовали только дисомные растения.

Изучение локализации антоциановых пигментов в оболочках семян проводилось путем анализа поперечных срезов зерновок на стадии восковой спелости. У изученных линий в клетках алейронового слоя наблюдали скопление мелких синих включений в органеллах, похожих на вакуоли. В перикарпе наблюдали накопление красно-коричневых пигментированных структур, содержащих антоцианы (см. рис. 1, в).



Рис. 1. Колос (а), зерновка (б) и поперечный срез зерновки (в) линии BW1

Проведена ПЦР с использованием праймеров, разработанных к генам биосинтеза антоцианов *Ba1*, *Pp-1* и *Pp3*. ДНК-маркер *ThMYC4E* на хромосому 4E *Th. ponticum* [7] был использован для детекции доминантного аллеля гена *Ba1* у линий S29BW1-4 по присутствию фрагмента амплификации длиной 450 п.н. (см. рис. 2, а). При использовании внутригенного маркера *Pp1-diagnostic* [8] ПЦР-продукт размером 478 п.н., выявленный у S29, соответствовал рецессивным аллелям генов *Pp-A1* и *Pp-B1*, в то время как ПЦР-продукты, полученные из ДНК линий с черной окраской зерна, содержали наряду с фрагментом длиной 478 п.н. фрагменты длиной 434 п.н., соответствующие доминантному аллелю гена *Pp-D1* (см. рис. 2, б). При использовании маркера *Pp3-diagnostic* [8] получены ПЦР-продукты длиной 398 и 429 п.н., соответствующие доминантным (у S29BW1-4) и рецессивным (у S29) аллелям гена *Pp3* соответственно (см. рис. 2, в).

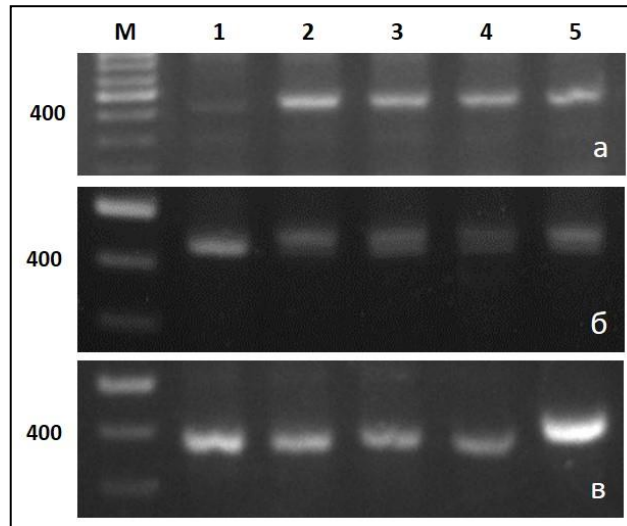


Рис. 2. Идентификация генов *Bal*, *Pp3* и *Pp-D1* у линий с черной окраской зерна с использованием ДНК-маркеров *ThMYC4E* (а), *Pp1-diagnostic* (б) и *Pp3-diagnostic* (в). М – 100 bp Ladder. 1 – S29, 2 – 5 S29BW1-4

Изученные линии различались по содержанию антоцианов (см. таблицу). Голубозерная родительская линия s:S294Th(4B) имела более высокий уровень общего содержания антоцианов (135 мкг/г), чем фиолетовозерные изогенные линии (i:S29*Pp-1Pp3*^P – 79,4 мкг/г и i:S29*Pp-1Pp3*^{PF} – 81,5 мкг/г) ($p \leq 0,05$). Данные по содержанию антоцианов приведены для линий S29BW2 и S29BW3. В целом, содержание антоцианов у линий с черной окраской зерна было выше, по сравнению с исходными родительскими линиями. Среди пяти растений линии S29BW2 содержание антоцианов составило 145,5-167,1 мкг/г, за исключением одного растения, у которого этот показатель составил 119,7 мкг/г, что меньше, чем у голубозерной линии. Среди шести изученных растений линии S29BW3 у четырех из них содержание антоцианов превышало уровни родительских линий (154,25-166,8 мкг/г), при этом у одного растения было выявлено максимальное содержание антоцианов – 241,3 мкг/г ($p \leq 0,05$). В то же время у двух растений содержание антоцианов составило 123,33 мкг/г и 125,33 мкг/г. Такое различие в содержании антоцианов у отдельных растений, вероятно, зависит от аллельного состояния генов *Pp* и *Bal* (*Pp* в гетерозиготном, либо *Bal* в моносомном состоянии).

Описанные в данной работе линии с черной окраской зерна планируется использовать для гибридизации с районированными сортами с целью получения перспективных генотипов, сочетающих высокое содержание антоцианов с комплексом хозяйственно ценных признаков, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве исходного материала для селекции яровой мягкой пшеницы в Западной Сибири.

Общее содержание антоцианов (мкг/г) в муке линий с различной окраской зерна

Генотип	Общее содержание антоцианов, мкг/г (M±SEM)
i:S29Pp-1Pp3 ^P	79,35 ± 6,75 b
i:S29Pp-1Pp3 ^{PF}	81,55 ± 0,65 b
s:S294Th(4B)	135,9 ± 7,20 cde
Саратовская 29	9,95 ± 0,95 a
F ₅ : s:S294Th(4B) × i:S29Pp-D1Pp3 ^P (S29BW2) #1	167,05 ± 5,35 g
#2	145,5 ± 1,50 def
#3	119,75 ± 2,85 c
#4	157,65 ± 7,25 fg
#5	156,25 ± 0,65 efg
F ₅ : i:S29Pp-D1Pp3 ^{PF} × s:S294Th(4B) (S29BW3) #6	165,05 ± 1,45 fg
#7	123,3 ± 1,10 c
#8	154,25 ± 0,45 efg
#9	241,35 ± 2,55 h
#10	125,3 ± 3,20 cd
#11	166,8 ± 0,90 g

Различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 24-26-20028) и Министерства науки и инновационной политики Новосибирской области (№ р-99).

Список литературы

- 1 Garg M. et al. Rising demand for healthy foods-anthocyanin biofortified colored wheat is a new research trend // Front. Nutr. Frontiers Media S.A. 2022. Vol. 9. 878221.
- 2 Gonçalves A.C. et al. Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review // Pharm. 2021. Vol. 14. № 7. P. 690.
- 3 Lachman J. et al. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain – A review // J. Cereal Sci. 2017. Vol. 74. P. 145–154.
- 4 Abdel-Aal E.S.M., Young J.C., Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains // J. Agric. Food Chem. 2006. Vol. 54. № 13. P. 4696–4704.
- 5 Paznocht L. et al. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes // Plant, Soil Environ. 2020. Vol. 66. № 2. P. 57–64.
- 6 Efremova T.T. et al. Combining the genes of blue aleurone and purple pericarp in the genotype of spring bread wheat Saratovskaya 29 to increase anthocyanins in grain // J. Cereal Sci. 2023. Vol. 109. 103616.
- 7 Li N. et al. *ThMYC4E*, candidate *Blue aleurone 1* gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum* // PLoS One. 2017. Vol. 12 № 7. e0181116.
- 8 Gordeeva E. et al. Fine points of marker-assisted pyramiding of anthocyanin biosynthesis regulatory genes for the creation of black-grained bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines // Agronomy. 2022. Vol. 12. № 12. 2934.