

Молекулярно-генетическое изучение генов биосинтеза антоцианов, контролирующих окраску зерновки у ржи

А.Н. Буланов^{1*}, Е.А. Андреева^{1,2}, П.А. Зыкин², Г.Д. Решетникова², А.В. Евстигнеева¹,
С.Б. Нопимбонг Нипимбо², Н.В. Цветкова², А.В. Войлоков¹

¹ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* an.bulanov20002014@gmail.com

Цель: Формы культурных злаков с обогащенным антоцианами зерном представляют интерес для селекции, что связано с положительными эффектами этих соединений на здоровье человека. В отличие от других злаков, гены биосинтеза антоцианов у ржи (*Secale cereale* L.) изучены недостаточно. Мы идентифицировали в геноме ржи структурные гены-кандидаты для описанных ранее мутаций безантоциановости (*vi1*, *vi2*, *vi3* и *vi6*), а также ключевые регуляторные гены (*Vs*, *Rc-4R* и *ScPAC1-6R*), предположительно контролирующие накопление антоцианов в перикарпе и/или алейроне. Однако с молекулярно-генетической точки зрения особенности функционирования этих генов в зерновке у ржи остаются неизученными. Ранее мы обнаружили, что мутации безантоциановости *vi4* и *vi5* аллельны и затрагивают ген фиолетовозерности *Vs*, для которого был выявлен высокий уровень межлинейного нуклеотидного полиморфизма и который не экспрессируется у безантоциановой линии *vi4* и желтозерной линии L7, но проявляет высокую транскрипционную активность у фиолетовозерных линий Ф5-63 и RMu12. Целью данной работы является изучение структуры и функции ключевых генов, определяющих антоциановую пигментацию зерновки у ржи.

Материалы и методы: В работе использовали инбредные линии Петергофской генетической коллекции, различающиеся по пигментации перикарпа: безантоциановые линии *vi1*–*vi6*, желтозерную линию L7 с антоциановой пигментацией растения и фиолетовозерные линии Ф5-63, S10, RMu12 и RMu13. Уровень экспрессии генов биосинтеза антоцианов у ржи оценивали при анализе транскриптомов перикарпа зерновок, а также с использованием ПЦР-РВ. Определение нуклеотидных последовательностей исследуемых генов проводили секвенированием по Сэнгеру. Для секвенирования и анализа уровня экспрессии методом ПЦР-РВ использовали наборы геноспецифичных праймеров, разработанных на основе геномов и транскриптомов различных форм культурной и сорно-полевой ржи.

Результаты: Для установления генов биосинтеза антоцианов, функционирующих в зерновке у ржи, мы проанализировали транскриптомы перикарпа зерновок линий L7, *vi4*, Ф5-63 и RMu12, предположительно фиксированных по различным аллелям гена фиолетовозерности *Vs*. Как и для гена *Vs*, был обнаружен высокий уровень экспрессии генов-кандидатов мутаций *vi1*, *vi2*, *vi3* и *vi6* (*GST-7R*, *ANS-4R*, *DFR-3R* и *F3H-2R* соответственно) и других структурных генов биосинтеза антоцианов, а также регуляторного гена *Rc-4R* у фиолетовозерных линий, и существенно более низкий уровень экспрессии этих генов у линий без антоцианов в перикарпе. Эти данные свидетельствуют о том, что регуляторный ген *Vs* контролирует в зерновке уровень экспрессии комплементарного гена *Rc-4R* и основных структурных генов биосинтеза антоцианов, а также подтверждают, что гены-кандидаты известных мутаций безантоциановости вовлечены в формирование признака фиолетовозерности. При анализе уровня экспрессии генов *DFR-3R* и *F3H-2R* в зерновке у линий *vi1*, *vi2*, *vi3*, *vi6*, Ф5-63 и RMu12 с использованием ПЦР-РВ мы установили, что у безантоциановых линий уровень их экспрессии значительно ниже, чем у фиолетовозерных линий. При этом экспрессия гена *F3H-2R* полностью отсутствовала у линии *vi6*, а уровень экспрессии гена *DFR-3R* у линии *vi3* был кратно ниже, чем у остальных желтозерных линий. Полученные данные подтверждают, что мутации *vi6* и *vi3* затрагивают структурные гены *F3H-2R* и *DFR-3R* соответственно. При секвенировании последовательностей генов *Rc-4R* и *ScPAC1-6R*, предположительно регулирующих накопление антоцианов в зерновке совместно с геном *Vs*, у одиннадцати линий Петергофской генетической коллекции был обнаружен низкий уровень нуклеотидного полиморфизма этих генов, в основном представленный синонимичными заменами. Это позволяет предположить, что изменчивость у ржи по окраске перикарпа в первую очередь связана с аллельными различиями гена *Vs*.

Выводы: Структурные гены, являющиеся кандидатами мутаций безантоциановости *vi1*, *vi2*, *vi3* и *vi6*, экспрессируются в перикарпе зерновки и контролируют накопление антоцианов в этой ткани. Наиболее вероятно, что ген *Vs* регулирует экспрессию гена *Rc-4R* и их продукты совместно, формируя регуляторный комплекс, активируют экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов. При секвенировании последовательностей регуляторных генов *Rc-4R* и *ScPAC1-6R* у различных линий, в отличие от гена *Vs*, был обнаружен низкий уровень полиморфизма. Эти данные подтверждают ключевую роль аллельного разнообразия гена *Vs* в наблюдаемых различиях по окраске перикарпа зерновки у ржи.