



Взаимосвязь между содержанием антоцианов в основаниях листовых влагалищ у сортов ячменя и в зерне полученных на их основе гибридов

О. Ю. Шоева^{1,2}, Т. В. Кукоева^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Олеся Юрьевна Шоева, olesya_ter@bionet.nsc.ru

Актуальность. Создание сортов ячменя, накапливающих антоцианы в зерне, является актуальным направлением селекции, которая ведется по генам *Ant1* и *Ant2*. Для оптимизации селекционных схем и выбора исходного материала исследуется взаимосвязь между содержанием антоцианов в основаниях листовых влагалищ у сортов ячменя и в зерне гибридов, полученных на основе этих сортов.

Материалы и методы. Содержание антоцианов в листовых влагалищах оценивали на стадии кущения у 32 сортов и в зрелом зерне отобранных с помощью ДНК-маркеров 11 гибридов.

Результаты и обсуждение. Показано, что содержание антоцианов в листовых влагалищах у исследуемых сортов варьирует от 1 до 191 мг/кг. С помощью кластерного анализа определены три группы сортов – с низким, средним и высоким содержанием антоцианов. У гибридов, полученных при скрещивании сортов, отличающихся содержанием антоцианов в листовых влагалищах, с линией P18 – донором доминантного аллеля гена *Ant2*, содержание антоцианов в зерне варьировало от 22 до 71 мг/кг. Наблюдаемые различия между гибридами определялись генотипами индивидуальных растений и аллельным состоянием гена *Ant2*. Показана слабая корреляция ($r_s = 0,37$, $p = 0,036$) между содержанием антоцианов в листовых влагалищах исходных сортов и в зерне полученных на их основе гибридов.

Заключение. Результаты исследования позволяют оптимизировать селекционные схемы для получения сортов ячменя с высоким содержанием антоцианов в зерне и обосновывают необходимость тестирования содержания антоцианов в зерне индивидуальных линий.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., маркер-опосредованный отбор, функциональное питание, селекция

Благодарности: исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-76-10024. Выращивание растений в тепличном комплексе ЦКП «Ливр» было поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0017.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Шоева О.Ю., Кукоева Т.В. Взаимосвязь между содержанием антоцианов в основаниях листовых влагалищ у сортов ячменя и в зерне полученных на их основе гибридов. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(4):152-162. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-4-152-162

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-4-152-162

Relationship between the anthocyanin content values in the leaf sheath base of barley cultivars and in the grain of the hybrids derived from them

Olesya Yu. Shoeva^{1,2}, Tatjana V. Kukoeva^{1,2}¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*²*Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia***Corresponding author:** Olesya Yu. Shoeva, olesya_ter@bionet.nsc.ru

Background. The development of barley cultivars accumulating anthocyanins in grain is an important task for breeding, which is based on the *Ant1* and *Ant2* genes that control synthesis of these compounds. To optimize the breeding strategy and selection of the initial material, quantitative assay of anthocyanin content in the leaf sheath base of barley cultivars was carried out and the relationship between this parameter for some of the barley cultivars and anthocyanin content in grain of the hybrids derived from them was evaluated.

Materials and methods. The anthocyanin content in the leaf sheath base was studied in 32 barley cultivars in the tillering stage and in mature grains of 11 purple-grain hybrids selected from the hybrid populations using DNA-markers.

Results and discussion. It was shown that there were quantitative differences in the anthocyanin content in the leaf sheath base among barley cultivars, which varied from 1 to 191 mg/kg. A cluster analysis helped to identify three groups of cultivars: with low, medium and high anthocyanin content. The hybrids from crossing cultivars differing in their anthocyanin content in the leaf sheath base with line P18, the donor of the dominant allele of the *Ant2* gene, showed variation of the anthocyanin content in grain from 22 to 71 mg/kg. The observed differences among the hybrids were determined by the genotypes of individual plants and the allelic state of *Ant2*. A weak correlation ($r_s = 0.37$, $p = 0.0362$) was shown between the anthocyanin contents in the leaf sheath base and in the grain of the obtained hybrids.

Conclusion. The results of the study would help to optimize the breeding strategy for the development of new barley cultivars with high anthocyanin content in the grain and substantiate the need to test the anthocyanin content in the grain of individual lines.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., marker-assisted selection, functional food, breeding

Acknowledgements: the study was supported by the Russian Science Foundation, Grant No. 21-76-10024. Growing plants in the greenhouse facilities was supported by the budget project of the Institute of Cytology and Genetics, RAS, No. FWNR-2022-0017.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Shoeva O.Yu., Kukoeva T.V. Relationship between the anthocyanin content values in the leaf sheath base of barley cultivars and in the grain of the hybrids derived from them. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(4):152-162. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-4-152-162

Введение

У ячменя (*Hordeum vulgare* L., $2n = 2x = 14$, НН) известны формы с фиолетовой окраской зерна, цвет которых обусловлен антоциановыми соединениями, накапливающимися в перикарпии зерновки под контролем двух комплементарно взаимодействующих генов: *Ant1*, картированным на коротком плече хромосомы 7Н, и *Ant2*, локализованным на длинном плече хромосомы 2Н (Zhang et al., 2017; Shoeva et al., 2018). Такие образцы ячменя распространены преимущественно в высокогорных и предгорных районах Эфиопии и Эритреи, Малой Азии, Сирии, Палестины, Месопотамии и Закавказья (Vavilov, 1967). Была показана повышенная антиоксидантная активность фракции отрубей фиолетовозерных образцов ячменя, содержащих антоцианы, по сравнению с белозерными и чернозерными образцами, не содержащими этих соединений (Bellido, Beta, 2009). В настоящее время разрабатываются рецептуры хлебобулочных изделий на основе ячменной муки и/или отрубей, содержащих антоцианы (Martínez-Subirà et al., 2020). Во многих странах, в России в частности, ведутся селекционные программы по улучшению пищевой ценности ячменя с помощью насыщения их зерновок антоциановыми соединениями, в том числе с использованием молекулярных маркеров, разработанных к регуляторным генам биосинтеза антоцианов (Bellido, Beta, 2009; Zhu, 2018; Kukoeva et al., 2020; Loskutov, Khlestkina, 2021; Shvachko et al., 2021).

С помощью полногеномного анализа ассоциаций было установлено, что ген *Ant2* (синоним *Pre2*, *Red lemma* and *pericarp 2*) контролирует антоциановую окраску остей, ушек листового влагалища и жилок леммы (Cockram et al., 2010), а с помощью сравнительного анализа транскрипции показано его участие в формировании фиолетовой окраски перикарпия зерновки (Shoeva et al., 2016). Ген *Ant2* является ортологом генов *Pp3*, *Lc* и *Rb*, контролирующими антоциановую окраску зерна пшеницы, кукурузы и риса соответственно; он кодирует транскрипционный фактор с регуляторным доменом bHLH (Ludwig et al., 1989; Wang, Shu, 2007; Shoeva et al., 2014).

Второй комплементарный ген *Ant1* кодирует регуляторный фактор с доменом R2R3-MYB и, помимо окраски зерна, определяет также антоциановую окраску оснований листовых влагалищ растения (Himi, Taketa, 2015; Shoeva et al., 2015; Zakhrabekova et al., 2015; Yao et al., 2018; Gordeeva et al., 2019). Поскольку одни и те же гены контролируют биосинтез антоцианов в зерне и в вегетативных органах, можно ожидать наличия количественных взаимосвязей между содержанием этих соединений в различных частях растений. Наличие таких взаимосвязей поможет оптимизировать выбор исходного материала при селекции ячменя на повышенное содержание антоцианов в зерне, а также отбор гибридов с окрашенным зерном. Однако возможность прогнозирования содержания антоцианов в зерне по содержанию этих соединений в листовых влагалищах растений исходных генотипов нуждается в экспериментальной проверке.

Целью данной работы является выявление взаимосвязи между содержанием антоцианов в основании листовых влагалищ у сортов ячменя и в зерне полученных на основе этих сортов гибридов.

Материалы и методы

Растительный материал

Для оценки содержания антоцианов в основаниях листовых влагалищ растений были выбраны 32 образца ярового ячменя из коллекций Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург, Россия), ГенАгро (Новосибирск, Россия), NordGen (Альнарп, Швеция) и Gatersleben (Гатерслебен, Германия) (табл. 1). В качестве донора доминантного аллеля гена *Ant2* использовалась линия P18 (i:Bwant1Ant2), которая характеризуется неокрашенным зерном и отсутствием антоцианов в листовых влагалищах растений, обусловленным рецессивными аллелями гена *Ant1* (Gordeeva et al., 2019). Она получена на основе линии PLP (синонимы: BW648, i:BwAnt1Ant2), имеющей фиолетовую окраску зерновки. За исключением линии PLP, все исследуемые образцы имели неокрашенное зерно.

Таблица 1. Используемые в исследовании образцы ячменя

Table 1. Barley accessions used in the current study

Каталожный номер / Catalogue No.	Название / Name	Происхождение (организация, страна) / Origin (institution, country)	Год включения в реестр / Year of inclusion in the catalogue
ИЦиГ-8515	Авалон	Франция	2014
ИЦиГ-8516	Алей	ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий», Барнаул, Россия	2016
ИЦиГ-8517	Арна	ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства», Казахстан	1997
ИЦиГ-8464	Арчекас	Кемерово, Россия	2003?
к-30984	Биом	СибНИИРС, Новосибирская область, Россия	2007
ИЦиГ-8521	Ворсинский 2	Алтайский научно-исследовательский институт земледелия и селекции сельскохозяйственных культур, АНИИЗиС, Россия	2011
к-30845	Золотник	Алтайский НИИ земледелия и селекции с/х культур, АНИИЗиС, Россия	2003

Таблица 1. Окончание
Table 1. The end

Каталожный номер / Catalogue No.	Название / Name	Происхождение (организация, страна) / Origin (institution, country)	Год включения в реестр / Year of inclusion in the catalogue
к-29435	Импульс	Красноуфимская селекционная станция Свердловская область, Россия	1988
к-19829	Красноярский 1	Красноярский НИИСХ, Россия	1967
к-26740	Курьер	Краснодарский НИИСХ, Россия	1981
к-27058	Линия 421	ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия	1982
к-29622	Маяк	Красноярск, Россия	1990
ИЦИГ-8530	Мерит 57	США	2010
к-15010	Местный	Дагестан, Россия	1935
к-20042	Л. ANOR 2550/63	Эфиопия	1969
к-19417	Московский 121	НИИ СХ Центральных районов нечерноземной зоны, Россия	1964
к-26848	Новосибирский 80	СибНИИРС, Новосибирская область, Россия	1986
к-29465	Носовский 11	Чернигов, Украина	1989
ИЦИГ-8458	Омский голозерный 2	ФГБНУ «Сибирский НИИСХ», Омск, Россия	2008
к-29496	Оренбургский кормовой	Оренбургский НИИ сельского хозяйства, Россия	1989
к-28885	Рейд	Красноуфимская селекционная станция, Свердловск, Россия	1986
к-31110	Саша	ФГБНУ «Сибирский НИИСХ», Омск, Россия	2012
к-29009	Светик	Архангельская область, Россия	1986
к-30846	Сигнал	АНИИЗиС, СибНИИРС, Россия	1997
к-30245	Соболек	Красноярский НИИСХ, Россия	1995
ИЦИГ-8533	Сымбат	ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства», Казахстан	2011
к-29001	Таганай	Челябинская область, Россия	1986
ИЦИГ-8535	Танай	СибНИИРС, Новосибирская область, Россия	2014
к-30150	Тарский 1	СибНИИСХ, Омская область, Россия	1994
NGB22812	Bowman	Государственный университет Северной Дакоты, США	1985
HOR13475	Golden Promise	Великобритания	1999
NGB22213	PLP	Государственный университет Северной Дакоты, США	2010

Примечание: к-... – номер по каталогу ВИР; ИЦИГ-... – каталожный номер ГенАгро; HOR... – каталожный номер Gatersleben; NGB... – каталожный номер NordGen

Note: к-... – catalogue number in the VIR collection; ИЦИГ-... – catalogue number in the GenAgro collection; HOR... – catalogue number in the Gatersleben collection; NGB... – catalogue number in the NordGen collection

Гибридные растения поколения F_2 с доминантными аллелями генов *Ant1* и *Ant2* получали при скрещивании образцов ячменя, отобранных на основе содержания антоцианов в основаниях их листовых влагалищ, с линией P18. Для этого у колосков с вышедшими на два сантиметра из трубки остями удаляли недозревшие пыльники с последующей их изоляцией и опылением через 1-2 дня зрелой пыльцой от молодых пылящих колосьев линии P18. Полученные гибридные растения F_1 самоопылялись. В поколении F_2 проводился отбор заданных генотипов.

Количественная оценка содержания антоцианов

Растения для количественной оценки содержания антоцианов в листовых влагалищах и в зерне выращивали в условиях гидропонной теплицы ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Содержание антоцианов оценивали с помощью спектрофотометра по методике, описанной ранее (Abdel-Aal, Hucl, 1999). Материал оснований листовых влагалищ длиной пять сантиметров, считая от корневой шейки, пяти растений ячменя на стадии кущения или 20–30 зрелых зерен измельчали до однородной массы в жидком азоте или в блендере соответственно. Экстракцию проводили в растворе 1-процентной HCl в метаноле (на 1 г навески 5 мл раствора) при 4°C в течение 12 часов с последующим центрифугированием и отбором пробы для измерения. Оптическую плотность антоцианов определяли в трех технических повторностях при длине волны $\lambda = 530$ нм. Измерения проводили на спектрофотометре SmartSpec TM Plus Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, USA). Сумму антоцианов рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, равного $25,965 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (в пересчете на цианидин-3-глюкозид, мг/кг).

Маркер-контролируемый отбор

Семена гибридов второго поколения F_2 , полученные в результате скрещивания сортов, отобранных на основе содержания антоцианов в листовых влагалищах растений, с линией P18, высаживали в ванну гидропонной теплицы ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Из молодых листьев выделяли ДНК согласно ранее описанной методике (Plaschke et al., 1995). Выделенную ДНК генотипировали с помощью ПЦР с использованием праймеров, амплифицирующих участки генов *Ant1* и *Ant2* (табл. 2). Праймеры были разработаны на основе нуклеотидных последовательностей генов *Ant1* (NCBI: KP265977) и *Ant2* (NCBI: KX035100), а также найденных по гомологии последовательностей этих генов в пангеноме ячменя (Jayakodi et al., 2020). При множественном выравнивании выявленных последовательностей обнаружены инсерции/делеции, к фланкирующим областям которых подобраны праймеры. ПЦР-продукты разной длины, получаемые с помощью разработанных праймеров, соответствовали разным аллелями генов *Ant1* и *Ant2*.

Реакционную смесь для ПЦР объемом 20 мкл, содержащую 5 мкл ДНК, 1,8 мМ MgCl_2 , 6 мкл H_2O , по 0,2 мМ каждого дНТФ, по 1 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы *Taq*, амплифицировали в режиме TOUCHDOWN: 13 циклов: предденатурация – 2 мин при 94°C, денатурация – 15 с при 94°C, отжиг матрицы с праймерами – 30 с при 65°C с понижением на 0,7°C/цикл, элонгация – 45 с при 72°C; 24 цикла: денатурация – 15 с при 94°C, отжиг матрицы с праймерами – 30 с при 56°C, элонгация – 30 с при 72°C; достраивание ПЦР-фрагментов – 5 мин при 72°C. Результаты ПЦР анализировали с помощью электрофоретического анализа в 2-процентном агарозном геле и последующей съемки

в гель-документирующей системе BioRad (Bio-Rad Laboratories).

Статистическая обработка результатов

Статистические гипотезы проверяли в программе Statistica v. 6.1 (StatSoft, Inc.). Достоверность различий между содержанием антоцианов в зерне у индивидуальных растений ячменя оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни, принимая отличия значимыми при $p < 0,05$. Кластерный анализ проводили с помощью метода Варда, используя в качестве меры расстояния между объектами кластера расстояния городских кварталов (манхэттенское расстояние).

Влияние на содержание антоцианов в зерне таких факторов, как «генотип исходного сорта», «генотип индивидуального растения», «аллельное состояние гена *Ant1*» и «аллельное состояние гена *Ant2*», определяли с использованием непараметрического *H*-критерия Краскала – Уоллиса, с *post-hoc* тестированием различий между группами критерием Даннета.

Корреляцию между содержанием антоцианов в листовых влагалищах растений исходных сортов и в зерне полученных на их основе гибридов оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Содержание антоцианов

в листовых влагалищах растений ячменя

Содержание антоцианов в основаниях листовых влагалищ растений было оценено у 32 сортов/линий ячменя, росших одновременно в условиях гидропонной теплицы. Концентрация антоцианов у исследуемых образцов варьировала в широком диапазоне от 1 до 191 мг/кг с минимальным содержанием антоцианов у сорта 'Светик' и максимальным – у сортов 'Рейд' и 'Авалон' (Приложение)¹. На основе полученных данных проведен кластерный анализ, с помощью которого все исследуемые образцы разделились на три группы (рис. 1). Первая группа, в которую вошли 14 сортов, характеризовалась отсутствием или низким содержанием антоцианов (концентрация которых варьировала от 1 до 45 мг/кг). Вторая группа со средним содержанием антоцианов (52–85 мг/кг) насчитывала 11 образцов ячменя. В группе с высоким содержанием антоцианов (105–109 мг/кг) попало 7 сортов.

На основе данных кластерного анализа были выбраны три сорта: 'Golden Promise', 'Красноярский 1' и 'Биом', которые характеризовались низкой, средней и высокой концентрациями антоцианов в основаниях листовых влагалищ растений соответственно. Отобранные сорта скрещивали с донором доминантного аллеля гена *Ant2* – линией P18.

Генотипирование и отбор гибридов ячменя

ДНК гибридов второго поколения F_2 , полученных в результате скрещивания сортов 'Golden Promise', 'Красноярский 1' и 'Биом' с линией P18, была генотипирована с помощью праймеров, амплифицирующих фрагменты генов *Ant1* и *Ant2*. Амплифицируемые ПЦР-фрагменты отличались по длине между родительскими формами, что позволило точно определить происхождение аллелей этих генов у полученных гибридов. В качестве примера на рисунке 2 приведены результаты генотипирования гибридов F_2 Красноярский 1 × P18.

¹ Electronic supplementary material. The online version of this article is available at (<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-4-152-162>).

Таблица 2. Структура и характеристики праймеров, используемых в работе
Table 2. Structure and characteristics of the primers used in the current study

Ген / Gene	Структура праймера, 5' → 3' / Primer structure, 5' → 3'	Т отжига, С° / Annealing T, С°	Длина ПЦР-продукта, пн / PCR product length, bp
<i>Ant1</i>	F: GCGGCTTGATTTGTTTCATA	55	455, 488
	R: TTAAATGGCGAGGTAAGGT		
<i>Ant2</i>	F: GCTGGAACACACGTACAAGA	55	514, 515, 635, 683, 719
	R: CTTTGAGCTATGGAGACCAAGAA		

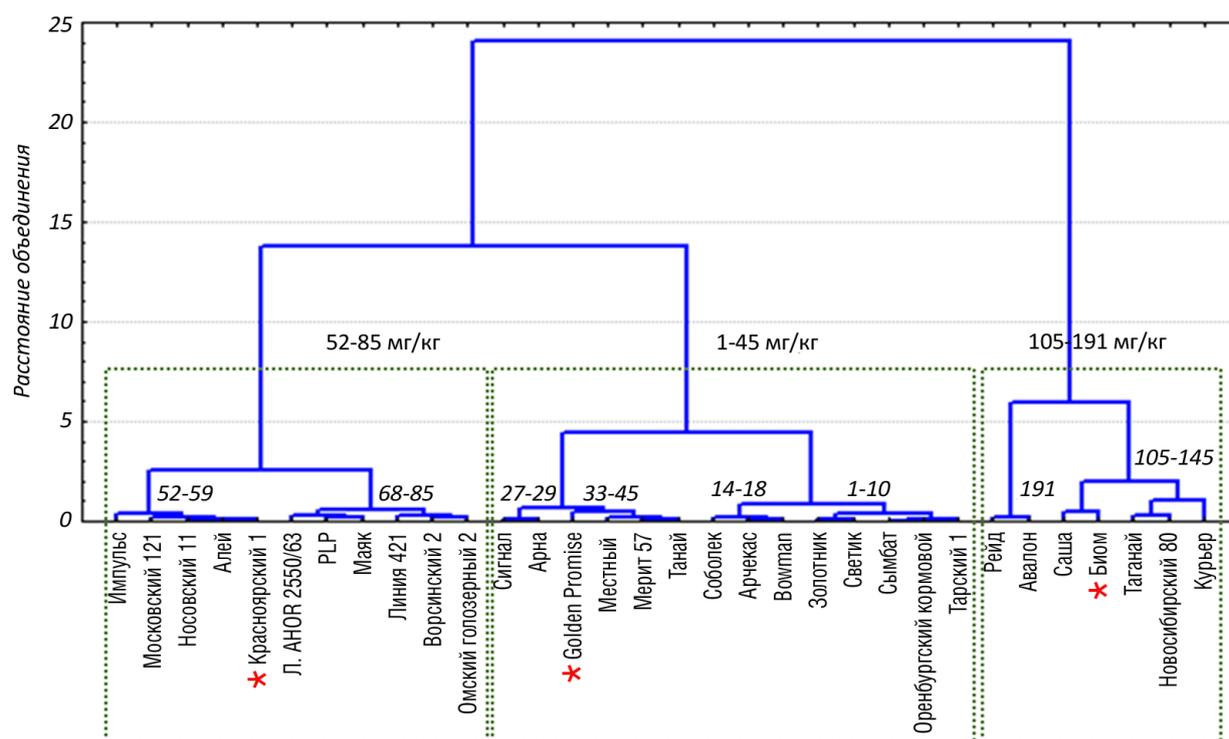


Рис 1. Дендрограмма 32 сортов/линий ячменя, построенная на основе данных по содержанию антоцианов в основаниях листовых влагалищ растений (зелеными прямоугольниками отмечены три кластера, в которых выделены подкластеры; цифры указывают варьирование концентраций антоцианов в листовых влагалищах растений в каждой из выделенных групп; * – сорта, отобранные для гибридизации с донором доминантного аллеля гена *Ant2*)

Fig. 1. Dendrogram of 32 barley cultivars/lines built on the basis of the data on the anthocyanin content in the leaf sheath base of plants (green rectangles mark three clusters, in which subclusters are identified; the numbers indicate the variation in anthocyanin content in the leaf sheath base of plants in each of the selected group; * – cultivars selected for crossing with the donor of the dominant allele of the *Ant2* gene)

ПЦР-продукт, полученный с помощью праймеров к гену *Ant1*, у сорта 'Красноярский 1' имеет длину 488 пн, а у линии Р18 – 455 пн. Поскольку сорт 'Красноярский 1' имеет окраску листовых влагалищ, а линия Р18 и сорт 'Bowman' не имеют, то можно предположить, что выявляемые с помощью этих праймеров аллели генов *Ant1* у этих сортов являются соответственно доминантным и рецессивным. ПЦР-продукты, получаемые с помощью праймеров к гену *Ant2*, также отличаются по длине: доминантный аллель гена *Ant2*, выявляемый у линий Р1Р и Р18, имеет длину 514 пн, а рецессивный аллель *ant2* сорта 'Красноярский 1' – 719 пн. Все гибриды, несущие доминантные аллели генов *Ant1* и *Ant2* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, харак-

теризовались фиолетовой окраской зерна. Для оценки количественного содержания антоцианов в зерне были выбраны фиолетовозерные гибриды № 2, № 9 и № 16 (табл. 3). Сходным образом с помощью генотипирования гибридов из популяций F₂ Golden Promise × Р18 и Биом × Р18 были отобраны пять и три гибрида соответственно (см. табл. 3).

Содержание антоцианов в зерне у гибридов

Проведена количественная оценка содержания антоцианов в зерне у отобранных гибридов (см. табл. 3). Показано, что существуют статистически значимые отличия в содержании антоцианов в зерне у гибридов, отобранных из одной гибридной комбинации.

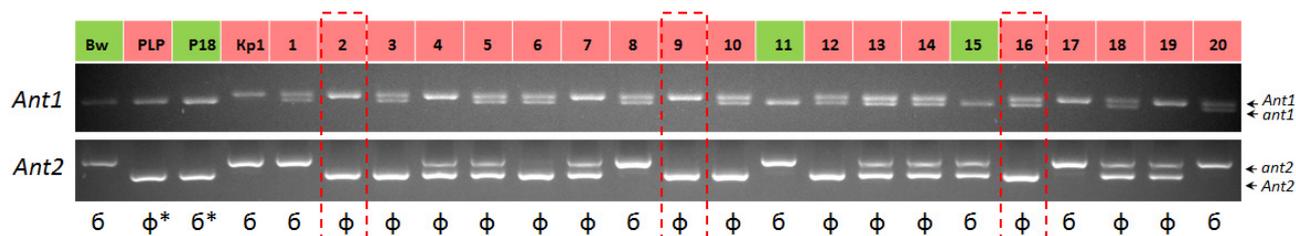


Рис. 2. Генотипирование сортов ‘Bowman’ (Bw), ‘Красноярский 1’ (Кр1), линий PLP, P18 и гибридов F₂, полученных в результате скрещивания сорта ‘Красноярский 1’ с линиями P18 (зеленым и розовым цветом показана окраска оснований листовых влагалищ; цвет зерна: б – белый, ф – фиолетовый; * – образцы имеют разные аллели гена *Ant1*, которые не выявляются с помощью используемых праймеров. Выделены образцы, отобранные для количественного анализа содержания антоцианов в зерне)

Fig. 2. Genotyping of cvs. ‘Bowman’ (Bw) and ‘Krasnoyarsky 1’ (Kr1), lines PLP and P18, and F₂ hybrids obtained by crossing cv. ‘Krasnoyarsky 1’ with P18 (green and pink show pigmentation of the leaf sheath bases; grain color: (б) white, (ф) purple; * – the accessions have different alleles of the *Ant1* gene, which are not detected with the primers used. The accessions selected for quantitative analysis of anthocyanin content in the grain are marked with red rectangles)

Таблица 3. Данные генотипирования по генам *Ant1* и *Ant2* и количественная оценка содержания антоцианов в зерне у гибридов

Table 3. *Ant1* and *Ant2* genotyping data and the amount of anthocyanins in the grain of hybrid plants

Гибридная комбинация / Hybrid combination	Номер растения / Plant No.	Аллельное состояние гена <i>Ant1</i> / Allelic state of <i>Ant1</i>	Аллельное состояние гена <i>Ant2</i> / Allelic state of <i>Ant2</i>	Содержание антоцианов в зерне, мг/кг / Anthocyanin content in grain, mg/kg
Golden Promise × P18	2	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2ant2</i>	35,0 ± 1,4 ^a
	11	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2ant2</i>	42,2 ± 3,9 ^b
	21	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	65,3 ± 7,9 ^c
	29	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2ant2</i>	22,4 ± 2,0 ^d
	33	<i>Ant1ant1</i>	<i>Ant2ant2</i>	64,2 ± 5,0 ^c
Биом × P18	23	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	39,8 ± 2,4 ^a
	35	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	61,0 ± 1,7 ^b
	38	<i>Ant1ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	71,6 ± 14,7 ^b
Красноярский 1 × P18	2	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	55,1 ± 6,5 ^a
	9	<i>Ant1Ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	55,4 ± 3,8 ^a
	16	<i>Ant1ant1</i>	<i>Ant2Ant2</i>	33,8 ± 3,4 ^b

Примечание: Разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между гибридами в содержании антоцианов в зерне при $p = 0,050$ (*U*-тест); сравнения проводились между гибридами одной и той же гибридной комбинации
 Note: Different superscripts indicate statistically significant differences between the hybrids in anthocyanin content in grain at $p = 0.050$ (*U*-test); comparisons were made between the hybrids of the same hybrid combination

Так, в комбинации Golden Promise × P18 зерно растения № 29 содержало наименьшее количество антоцианов (22,4 ± 2,0 мг/кг), что почти в три раза меньше, чем у гибридов № 21, № 33, содержащих 65,3 ± 7,9 и 64,2 ± 5,0 мг/кг антоцианов соответственно.

В гибридной комбинации Биом × P18 содержание антоцианов варьировало от 39,8 ± 2,4 у гибрида № 23 до 71,6 ± 14,7 мг/кг у гибрида № 38.

В гибридной комбинации Красноярский 1 × P18 наименьшее содержание антоцианов, которое составило 33,8 ± 3,4 мг/кг, было отмечено у растения № 16; два других отобранных гибрида № 2 и № 9 содержали значимо больше антоцианов в зерне, их концентрация составила 55,1 ± 6,5 и 55,4 ± 3,8 мг/кг соответственно.

Анализ взаимосвязи между содержанием антоцианов в листовых влагалищах и в зерне

Используя данные о содержании антоцианов в зерне, листовых влагалищах растений исходных сортов, аллельном состоянии генов *Ant1* и *Ant2* для одиннадцати гибридов, пять из которых были получены на основе сорта ‘Golden Promise’ и по три гибрида – на основе сортов ‘Биом’ и ‘Красноярский 1’, с помощью *H*-критерия Краскела – Уоллиса был проведен анализ влияния факторов «генотип исходного сорта», «генотип индивидуального растения», «аллельное состояние гена *Ant1*» и «аллельное состояние гена *Ant2*» на содержание антоцианов в зерне гибридных растений (табл. 4).

Таблица 4. Оценка влияния различных факторов на содержание антоцианов в зерне гибридов с помощью *H*-критерия Краскела – Уоллиса

Table 4. Effects of different factors on anthocyanin content in the grain of hybrid plants assessed by the Kruskal-Wallis *H*-test

Фактор / Factor	Группа / Group	Размер группы / Group size	Сумма рангов / Sum of ranks	df	H	Уровень значимости / <i>p</i> -value
Генотип родительского сорта / Genotype of parental cultivar	Golden Promise	15	227	2	3,46	0,177
	Биом	9	199			
	Красноярский 1	9	135			
Генотип индивидуального растения / Genotype of an individual plant	2 (GP)	3	21	10	29,27	0,001*
	2 (Кр1)	3	59			
	9	3	57			
	11	3	39			
	16	3	19			
	21	3	80			
	23	3	35			
	29	3	6			
	33	3	81			
	35	3	75			
Аллельное состояние гена <i>Ant1</i> / Allelic state of <i>Ant1</i>	гомозигота	24	372	1	2,12	0,146
	гетерозигота	9	189			
Аллельное состояние гена <i>Ant2</i> / Allelic state of <i>Ant2</i>	гомозигота	21	414	1	4,55	0,033*
	гетерозигота	12	147			

Примечание: * – статистически достоверное влияние фактора

Note: * – statistically significant effect of the factor

Показано, что из перечисленных факторов значимое влияние на содержание антоцианов в зерне оказывают «генотип индивидуального растения» и «аллельное состояние гена *Ant2*». В последнем случае у растений, несущих доминантные аллели гена *Ant2* в гомозиготном состоянии было больше антоцианов, чем у гетерозиготных ($54,56 \pm 14,14$ vs $40,96 \pm 16,12$; $p = 0,017$, тест Даннета), тогда как в случае гена *Ant1* таких закономерностей не выявлено ($56,53 \pm 19,07$ vs $47,02 \pm 14,40$, $p = 0,133$, тест Даннета).

Показано наличие слабой корреляции между содержанием антоцианов в основаниях листовых влагалищ исходных сортов ячменя и в зерне полученных на основе этих сортов гибридов ($r_s = 0,37$, $p = 0,036$).

Обсуждение

На сегодняшний день создание сортов зерновых культур, накапливающих антоциановые соединения в зерне, является актуальным направлением селекции (Bellido, Beta, 2009; Zhu, 2018; Kukoeva et al., 2020; Loskutov, Khlestkina, 2021; Shvachko et al. 2021). Ее эффективность может быть повышена за счет применения знаний о молекулярно-генетических основах синтеза этих соединений у растений. У ячменя синтез антоцианов в перикарпии зерновки контролируют два комплементарно взаимодействующих гена – *Ant1* и *Ant2*. С помощью индуцированного мутагенеза было показано, что оба эти гена необходимы также для синтеза антоцианов в вегетатив-

ных органах (Franckowiak et al., 1997). При этом наличие окраски вегетативных органов зачастую не сопровождается окраской зерна. Хотя на синтез антоцианов существенное влияние оказывают условия окружающей среды (Landi et al., 2015), при одинаковых условиях выращивания между образцами ячменя существуют количественные различия в содержании антоцианов. Так, содержание антоцианов в зерне образцов ячменя из коллекции ВИР одной и той же вегетации варьировало от 37 до 145 мг/кг (Lukina et al., 2021), а в проведенном исследовании – от 1 до 191 мг/кг в основаниях листовых влагалищ растений и от 22 до 71 мг/кг в зерне у гибридов. Количественные отличия могут быть обусловлены различными аллельными вариантами генов, контролирующими биосинтез антоцианов.

Описан аллель гена *Ant1* с делецией 25 нуклеотидов в 3'-некодирующей области, который был ассоциирован с отсутствием антоцианов в листовых влагалищах у сортов 'Bowman' и 'Mogex', тогда как у линии BW762 и сорта 'Bonus' с интенсивной окраской листовых влагалищ такая делеция не выявлена (Zakhrabekova et al., 2015). Кроме этого, обнаружены однонуклеотидные замены в промоторной области гена *Ant1*, которые предположительно могут влиять на количественные отличия в содержании антоцианов в листовых влагалищах (Shoeva et al., 2015).

Аллельные варианты также выявлены для гена *Ant2*. Среди европейских сортов распространен аллель с делецией 16 нуклеотидов в кодирующей области гена, ассоциированный с отсутствием антоциановой пигментации вегетативных органов (Cockram et al., 2010), тогда как из 108 сортов из коллекции ячменя ИЦиГ СО РАН такой аллель обнаружен лишь у сорта 'Арчекас' (неопубликованные данные). Ранее у фиолетовозерной линии ячменя PLP была описана делеция 179 пн в промоторе гена *Ant2* (Shoeva et al., 2016), для которой, однако, не показано ассоциации с синтезом антоцианов в перикарпии зерновки (Zhou et al., 2021). Кроме определенных аллелей, на эффективность синтеза антоцианов могут влиять особенности его регуляции. Так, ранее было показано, что при наличии доминантного аллеля одного из генов, контролирующих синтез антоцианов, происходит существенное усиление транскрипции комплементарного ему гена при условии, что последний также находится в доминантном состоянии (Gordeeva et al., 2019). Описанная регуляторная петля с положительной обратной связью была подтверждена экспериментально: с помощью оверэкспрессии только гена *Ant1* в зерне ячменя были получены образцы с фиолетовой окраской зерновки (Zhou et al., 2021).

Поскольку одни и те же гены контролируют синтез антоциановых пигментов в вегетативных органах и в зерне, можно предположить наличие количественной взаимосвязи между содержанием антоцианов в этих органах, тестирование которой было проведено в данной работе. Для этого были получены и отобраны с помощью молекулярных маркеров гибриды ячменя, у которых доминантный аллель гена *Ant2* имел общее происхождение от линии P18, тогда как доминантные аллели генов *Ant1* были унаследованы от родительских сортов и отличались между гибридами. Полученные гибриды отличались содержанием антоцианов в зерне.

Между содержанием антоцианов в листовых влагалищах исходных растений и в зерне полученных гибридов была выявлена слабая, но значимая корреляция. Среди дополнительных факторов, определяющих содержание антоцианов в зерне, были выявлены такие, как «генотип

индивидуального растения» и «аллельное состояние гена *Ant2*». В последнем случае наблюдалось повышенное содержание антоцианов в зерне у линии с доминантным аллелем гена *Ant2* в гомозиготном состоянии по сравнению с линиями, у которых доминантный аллель этого гена находился в гетерозиготном состоянии.

На молекулярном уровне фактор «генотип индивидуального растения» подразумевает наличие ячменя, кроме генов *Ant1* и *Ant2*, дополнительных генов, которые влияют на содержание антоцианов в зерне, и вследствие комбинативной изменчивости разные гибриды имеют разные аллели этих генов. К таким генам можно отнести структурные гены, кодирующие ферменты метаболического пути биосинтеза антоцианов, а также многочисленные гены, кодирующие репрессоры, и малые некодирующие молекулы РНК (miRNA) (LaFountain, Yao-Wu, 2021).

Заключение

Проведенное исследование показало, что несмотря на наличие общих генов *Ant1* и *Ant2*, контролирующих синтез антоцианов одновременно и в зерне, и в вегетативных органах, определяющее влияние на содержание антоцианов в зерне у гибридов оказывает генотип индивидуального растения, что подразумевает, кроме генов *Ant1* и *Ant2*, наличие дополнительных генов, модулирующих синтез этих соединений. С практической точки зрения полученные результаты позволяют обосновать необходимость отбора и тестирования на содержание антоцианов индивидуальных линий, полученных в рамках одной гибридной комбинации, поскольку количественные отличия между ними в содержании антоцианов в зерне могут быть существенными.

References / Литература

- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*. 1999;76(3):350-354. DOI: 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Bellido G.G., Beta T. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(3):1022-1028. DOI: 10.1021/jf802846x
- Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M. et al. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(50):21611-21616. DOI: 10.1073/pnas.1010179107
- Franckowiak J.D., Lundqvist U., Konishi T. New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genetics Newsletter*. 1997;26:22-516.
- Gordeeva E.I., Glagoleva A.Yu., Kukoeva T.V., Khlestkina E.K., Shoeva O.Yu. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network. *BMC Plant Biology*. 2019;19(Suppl 1):52. DOI: 10.1186/s12870-019-1638-9
- Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues. *Molecular Genetics and Genomics*. 2015;290(4):1287-1298. DOI: 10.1007/s00438-015-0991-0

- Jayakodi M., Padmarasu S., Haberer G., Bonthala V.S., Gundlach H., Monat C. et al. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature*. 2020;588(7837):284-289 DOI: 10.1038/s41586-020-2947-8
- Kukoeva T.V., Strygina K.V., Glagoleva A.Yu., Grigoryev Yu.N., Shoeva O.Yu., Khlestkina E.K. Development of a genetic-breeding approach for obtaining new varieties of barley with an increased content of anthocyanins in grain. In: *Genetic Diversity and Plant Breeding: reports and presentations of the V International Conference (Novosibirsk, November 11–13, 2020) (Genofond i selektsiya rasteniy: doklady i soobshcheniya V Mezhdunarodnoy konferentsii [Novosibirsk, 11–13 noyabrya 2020 g.]*. Novosibirsk; 2020. p.165-168. [in Russian] (Кукоева Т.В., Стрыгина К.В., Глаголева А.Ю., Григорьев Ю.Н., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Разработка генетико-селекционного подхода для получения новых сортов ячменя с повышенным содержанием антоцианов в зерне. В кн.: *Генофонд и селекция растений: доклады и сообщения V Международной конференции (Новосибирск, 11–13 ноября 2020 г.)*. Новосибирск; 2020. С.165-168). DOI: 10.18699/GPB2020-43
- LaFountain A.M., Yuan Y.W. Repressors of anthocyanin biosynthesis. *New Phytologist*. 2021;231(3):933–949. DOI: 10.1111/nph.17397
- Landi M., Tattini M., Gould K.S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant–environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*. 2015;119:4-17. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.012
- Loskutov I.G., Khlestkina E.K. Wheat, barley, and oat breeding for health benefit components in grain. *Plants*. 2021;10(1):86. DOI: 10.3390/plants10010086
- Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L., Wessler S.R. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcription activators and contains the myx-homology region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(18):7092-7096. DOI: 10.1073/pnas.86.18.7092
- Lukina K.A., Shoeva O.Y., Kovaleva O.N., Loskutov I.G. Anthocyanin content in grains of barley and oat accessions from the VIR collection. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(3):5-14. [in Russian] (Лукина К.А., Шоева О.Ю., Ковалева О.Н., Лоскутов И.Г. Содержание антоцианов в образцах зерновок ячменя и овса из коллекции ВИР. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(3):5-14). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-3-04
- Martínez-Subirá M., Romero M.-P., Macià A., Puig E., Romagosa I., Moralejo M. Bioactive compounds and antioxidant capacity in pearling fractions of hulled, partially hull-less and hull-less food barley genotypes. *Foods*. 2021;10(3):565. DOI: 10.3390/foods10030565
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;91(6-7):1001-1007. DOI: 10.1007/BF00223912
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. *Molecules*. 2014;19(12):20266-20279. DOI: 10.3390/molecules191220266
- Shoeva O.Y., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Barley *Ant1* is a homolog of maize *CI* and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath. *Plant Breeding*. 2015;134(4):400-405. DOI: 10.1111/pbr.12277
- Shoeva O.Y., Mock H.P., Kukoeva T.V., Boerner A., Khlestkina E.K. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163782. DOI: 10.1371/journal.pone.0163782
- Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):333-342. [in Russian] (Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):333-342). DOI: 10.18699/VJ18.369
- Shvachko N.A., Loskutov I.G., Semilet T.V., Popov V.S., Kovaleva O.N., Konarev A.V. Bioactive components in oat and barley grain as a promising breeding trend for functional food production. *Molecules*. 2021;26(8):2260. DOI: 10.3390/molecules26082260
- Vavilov N.I. Centers of origin of cultivated plants (Tsentry proiskhozhdeniya kulturnykh rasteniy). In: *N.I. Vavilov. Selected works: In 2 volumes. Vol. 1 (N.I. Vavilov. Izbrannye proizvedeniya: V 2 t. T. 1)*. Leningrad: Nauka; 1967. p.88-202. [in Russian] (Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. В кн.: *Н.И. Вавилов. Избранные произведения: В 2 т. Т. 1*. Ленинград: Наука; 1967. С.88-202).
- Wang C., Shu Q. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*. 2007;52:3097-3104. DOI: 10.1007/s11434-007-0472-x
- Yao X., Wu K., Yao Y., Bai Y., Ye J., Chi D. Construction of a high-density genetic map: genotyping by sequencing (GBS) to map purple seed coat color (*Psc*) in hullless barley. *Heredity*. 2018;155(1):37. DOI: 10.1186/s41065-018-0072-6
- Zakhrabekova S., Dockter C., Ahmann K., Braumann I., Gough S.P., Wendt T. et al. Genetic linkage facilitates cloning of *Ert-m* regulating plant architecture in barley and identified a strong candidate of *Ant1* involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. 2015;88(6):609-626. DOI: 10.1007/s11103-015-0350-x
- Zhang X.W., Jiang Q.T., Wei Y.M., Liu C. Inheritance analysis and mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling individual anthocyanin compounds in purple barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183704. DOI: 10.1371/journal.pone.0183704
- Zhou C., Zeng Z., Suo J., Li X., Bian H., Wang J. et al. Manipulating a single transcription factor, *Ant1*, promotes anthocyanin accumulation in barley grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(18):5306-5317. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c08147
- Zhu F. Anthocyanins in cereals: Composition and health effects. *Food Research International*. 2018;109:232-249. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.04.015

Информация об авторах

Олеся Юрьевна Шоева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), Курчатовский геномный центр – филиал ИЦиГ СО РАН, 630090 Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, olesya_ter@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5289-8631>

Татьяна Владимировна Кукоева, старший лаборант, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), Курчатовский геномный центр – филиал ИЦиГ СО РАН, 630090 Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, kukoeva@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1425-7849>

Information about the authors

Olesya Yu. Shoeva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kurchatov Genomic Center, 10, Akademika Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090 Russia, olesya_ter@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5289-8631>

Tatjana V. Kukoeva, Senior Laboratory Assistant, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kurchatov Genomic Center, 10, Akademika Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090 Russia, kukoeva@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1425-7849>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 21.01.2022; одобрена после рецензирования 04.05.2022; принята к публикации 01.12.2022.
The article was submitted on 21.01.2022; approved after reviewing on 04.05.2022; accepted for publication on 01.12.2022.