

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 574/577

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146



Влияние локусов *Ant25*, *Ant26*, *Ant27*, контролирующих синтез проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.), на рост и развитие растений

И. В. Тоцкий¹, Ж. Ли², О. Ю. Шоева^{1,2}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Актуальность. Зерно ячменя содержит флавоноидные соединения – проантоцианидины. Положительно влияя на адаптацию растений, они могут ухудшать качество сырья, используемого в производстве кормов и в пищевой промышленности. В этой связи создание беспроантоцианидиновых сортов является актуальной задачей. В качестве доноров рецессивных аллелей генов, специфически контролирующих синтез проантоцианидинов в зерне, могут использоваться мутанты по локусам *Ant25*, *Ant26*, *Ant27*, молекулярные функции которых неизвестны. В представленной работе исследовано влияние мутантных аллелей в указанных локусах на показатели роста и развития растений ячменя и на основании полученных результатов сделан вывод об их функциональной роли в биосинтезе флавоноидов, а также о целесообразности использования мутантов по этим локусам в селекции беспроантоцианидиновых сортов.

Материалы и методы. У выращенных в гидропонной теплице мутантов и исходных сортов измеряли массу зерен, корней, побегов, длину главного побега и подсчитывали количество боковых побегов. Индекс урожая рассчитывали как отношение массы зерна к общей биомассе растения. Различия между генотипами оценивали с помощью критерия Манна – Уитни.

Результаты. Мутанты *ant25.264* и *ant27.488* характеризовались меньшими значениями всех анализируемых параметров по сравнению с исходными сортами 'Secobra18193' и 'Zenit'. Мутант *ant27.2043* имел меньшую длину главного побега, массу зерен и индекс урожая по сравнению с сортом 'Arena' и не отличался от исходного сорта по массе корней, массе побегов и их количеству. Мутанты по локусу *Ant26* не отличались от исходного сорта 'Grit' по всем параметрам, за исключением мутанта *ant26.486*, который имел большую массу корней по сравнению с сортом.

Заключение. Установлено влияние локусов *Ant25* и *Ant27* на рост и развитие растений. Мутанты по локусу *Ant26*, ввиду отсутствия негативного влияния на развитие растений, являются перспективными донорами для селекции беспроантоцианидиновых сортов ячменя.

Ключевые слова: *Anthocyanin-less*-мутанты, конденсированные танины, флавоноиды, пивоваренный сорт

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: Тоцкий И.В., Ли Ж., Шоева О.Ю. Влияние локусов *Ant25*, *Ant26*, *Ant27*, контролирующих синтез проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.), на рост и развитие растений. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(2):138-146. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146

The effect of the *Ant25*, *Ant26* and *Ant27* loci controlling proanthocyanidin synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) grain on plant growth and development

Igor V. Totsky¹, Ruixuan Li², Olesya Yu. Shoeva^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Corresponding author: Olesya Yu. Shoeva, olesya_ter@bionet.nsc.ru

Background. Barley grain contains such flavonoid compounds as proanthocyanidins. Despite their positive effect on plant adaptation to environmental conditions, they can worsen the quality of raw materials used in barley products. In this context, releasing proanthocyanidin-free cultivars is an important task. Mutants at the *Ant25*, *Ant26* and *Ant27* loci with unknown molecular functions can be used as donors of recessive alleles of the genes specifically controlling proanthocyanidin synthesis in barley grain. This study explored the effect of these loci on barley plant growth and development. A conclusion was made about their functional role in the biosynthesis of flavonoids and the expediency of using such mutants in the breeding of proanthocyanidin-free cultivars.

Materials and methods. The weight of grains, roots and shoots, the length of the main shoot, and the number of lateral shoots were measured in mutants and original cultivars grown in a hydroponic greenhouse. The harvest index was calculated as the ratio of grain weight to total plant biomass. Differences between genotypes were assessed using the Mann–Whitney *U*-test.

Results. The *ant25.264* and *ant27.488* mutants showed lower values of all analyzed characters than the parental cultivars ‘Secobra18193’ and ‘Zenit’, respectively. The *ant27.2043* mutant had a shorter main shoot, less grain weight, and lower harvest index compared to cv. ‘Arena’, but did not differ from the original cultivar in other characters. Mutants at the *Ant26* locus demonstrated no differences from the parental cultivar ‘Grit’ in all parameters, except the *ant26.486* mutant whose root weight exceeded the cultivar’s value.

Conclusion. The effect of the *Ant25* and *Ant27* loci on plant growth and development was proved. Mutants at the *Ant26* locus, with no negative effect on plant development, may be recommended to barley breeders as promising donors for the development of proanthocyanidin-free cultivars.

Keywords: Anthocyanin-less mutants, condensed tannins, flavonoids, malting cultivar

Acknowledgements: the study was funded by the Russian Science Foundation (Grant No. 21-76-10024). Cultivation of barley plants at the greenhouse facility was supported under the project of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (FWNR-2022-0017).

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

For citation: Totsky I.V., Li R., Shoeva O.Yu. The effect of the *Ant25*, *Ant26* and *Ant27* loci controlling proanthocyanidin synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) grain on plant growth and development. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(2):138-146. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146

Введение

Ячмень – одна из важнейших зерновых культур. В нашей стране она занимает второе место по площадям посевов после пшеницы. Ячмень выращивают для производства кормов, а также как сырье для пивоваренной и пищевой промышленности. К качеству зерна ячменя, в зависимости от его целевого использования, предъявляют разные требования, что приводит к появлению специализированных сортов. В частности, наличие в зерне проантоцианидинов (ПА) по-разному влияет на качество сырья и определяет направление, в котором такое сырье будет использоваться.

ПА относятся к полимерным флавоноидным соединениям, образованным молекулами катехина, эпикатехина и галлокатехина. У растений эти соединения синтезируются, как правило, в листьях, цветках, плодах, семенах, коре и корнях (Abeyapaya et al., 2011; Yu et al., 2020). Они играют важную роль в регуляции роста и развития растений, а также состояния покоя и прорастания семян (Yu et al., 2020). Кроме этого, ПА обуславливают устойчивость растений к различным типам стресса, оказывают сдерживающее действие на травоядных насекомых и хищничество птиц (Xie et al., 2019; Yu et al., 2020; Lam et al., 2023).

Положительно влияя на адаптацию растений, ПА могут ухудшать качество сырья, используемого в кормовой и пищевой промышленности. Поскольку ПА способны образовывать комплексы с пролин-богатыми белками, в том числе с пищеварительными ферментами, они негативно влияют на усвояемость белков, снижая продуктивность сельскохозяйственной птицы. К примеру, цыплята, в рационе которых присутствовало высокое содержание ПА, показали меньшую продуктивность, чем цыплята, в рационе которых ПА не было либо их содержание было ниже (Nyamambi et al., 2000). Однако отрицательно влияя на продуктивность молодых цыплят, ПА способствовали повышению продуктивности кур при их добавлении вместо антибиотиков в рацион взрослых птиц (Huang et al., 2018; Kumar et al., 2022). Интересно, что в природе птицы предпочитают беспроантоцианидиновое зерно сорго (Xie et al., 2019). Кроме этого, способность ПА образовывать нерастворимые комплексы с белками отрицательно влияет на качество пива, обуславливая его коллоидное помутнение. Для решения этой проблемы были созданы сорта, не накапливающие ПА в зерне (Von Wett-

stein, 2007). Помимо пивоваренной промышленности, такие сорта находят свое применение при производстве продуктов питания. На рынке особую популярность приобретают крупы на основе беспроантоцианидиновых сортов ячменя, приготовленные каши из которых не приобретают непривлекательного для потребителя серого оттенка (Tonooka et al., 2010; Yanagisawa et al., 2011; Lee et al., 2016).

Все созданные к настоящему моменту беспроантоцианидиновые сорта ячменя были получены на основе *Anthocyanin-less (Ant)*-мутантов ячменя с нарушенным синтезом флавоноидов. Сегодня коллекция таких мутантов насчитывает более 700 линий, сгруппированных с помощью тестов на аллелизм в 30 групп комплементации, или локусов (Lundqvist, 2014). Как показал мировой опыт, большинство мутантных аллелей из этой коллекции не могут быть использованы в селекции беспроантоцианидиновых сортов, поскольку приводят к существенному снижению урожайности и качества зерна (Von Wettstein, 2007). Среди локусов, успешно использованных в селекции, можно отметить *Ant28* и *Ant29*, мутации в которых специфически нарушают синтез ПА, но не влияют (либо влияют незначительно) на синтез других флавоноидных соединений (Shoeva, 2021). Для локуса *Ant28* была установлена молекулярная функция; показано, что он кодирует транскрипционный фактор с регуляторным доменом R2R3-MYB (Himi et al., 2012).

К локусам, специфически контролирующим синтез ПА, относятся также *Ant25*, *Ant26*, *Ant27*. Однако их молекулярные функции до сих пор не установлены, как и не определено их влияние на ростовые параметры растений. В представленной работе проводится исследование влияния мутаций в этих локусах на показатели роста и развития растений, что позволит не только определить молекулярные функции этих локусов, но и выявить перспективные доноры для селекции беспроантоцианидиновых сортов ячменя.

Материалы и методы

Растительный материал

Для оценки влияния мутаций в локусах *Ant25*, *Ant26* и *Ant27* на показатели роста и развития растений использовались индуцированные азидом натрия мутанты по этим локусам и их исходные сорта (табл. 1). Все изучаемые в работе мутанты характеризовались отсутствием

Таблица 1. Используемые в работе беспроантоцианидиновые мутанты

Table 1. Proanthocyanidin-free mutants used in the study

Мутант / Mutant	Исходный сорт / Original cultivar	Каталожный номер в генбанке NordGen / NordGen catalog No.	Год выделения / Year of obtaining
<i>ant25.264</i>	'Secobra18193'	NGB 13706	1988
<i>ant26.483</i>	'Grit'	NGB 13707	1991
<i>ant26.485</i>	'Grit'	NGB 13708	1991
<i>ant26.486</i>	'Grit'	NGB 23025	1991
<i>ant26.2002</i>	'Grit'	NGB 23027	1993
<i>ant26.2004</i>	'Grit'	NGB 23028	1993
<i>ant27.488</i>	'Zenit'	NGB 13709	1991
<i>ant27.2043</i>	'Arena'	NGB 13710	1993

ПА в зерне и наличием антоцианов в вегетативных органах (Jende-Strid, 1993). Зерна изучаемых генотипов были получены из генбанка NordGen (<https://www.nordgen.org>, Альнари, Швеция).

Для оценки показателей роста и развития растения анализируемых генотипов выращивали в ваннах гидропонной теплицы Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), заполненных керамзитом, при температуре 18–24°C и 16-часовом освещении с помощью газоразрядных натриевых ламп ДНАТ-600 В. Растения высаживали по одному ('Secobra18193', *ant25.264* – осень 2021 г.; 'Grit', *ant26.483*, *ant26.485*, *ant26.486*, *ant26.2002*, *ant26.2004* – весна 2022 г.) или по два ряда ('Zenit', *ant27.488*, 'Arena', *ant27.2043* – осень 2022 г.) по 15 зерен в каждом. По завершении вегетации растения, включая корни, высушивали при комнатной температуре в течение семи дней. Рощи у краев ванны растения в анализе не использовались. В итоге для каждого генотипа проанализировали по 10–25 растений.

Фенотипирование

Наличие антоцианов в основаниях листовых влагалищ растений оценивали визуально на стадии кущения. Собранные с выращенных растений зерно тестировали на наличие ПА с помощью качественной реакции, которую проводили, помещая зерна на 8 часов в 1 н. раствор NaOH с 0,01% TritonX. Тестирование проводили с использованием не менее пяти зерен каждого генотипа. О наличии ПА судили по появлению коричневой окраски зерна, тогда как желтый его цвет свидетельствовал об отсутствии этих соединений (Himi, Taketa, 2015).

Анализ показателей роста

У мутантных растений и растений исходных сортов проводили определение массы зерен с растения, измерение длины главного побега и подсчет количества боковых побегов согласно методическим указаниям (Loskutov et al., 2012). Определение массы сухих побегов и корней и расчет «индекса урожая» проводили согласно методическим рекомендациям (Нау, 1995). «Индекс урожая» рассчитывали как отношение массы зерна к общей биомассе, включающей массу зерна, стеблей и корней (Нау, 1995). Различия между исходными сортами и мутантами указывались в процентах, за 100% принимали показатели исходных сортов. Значимость различий между исходными сортами и мутантными образцами, а также различия между мутантами по локусу *Ant26*, полученными на одном генетическом фоне, оценивали с помощью критерия Манна – Уитни (*U*-теста), считая различия значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ проводился в программе Statistica v. 6.1 (StatSoft, Inc., Талса, Оклахома, США).

Результаты

Фенотипирование

Все исследуемые мутанты и исходные сорта были протестированы на наличие антоцианов в основаниях листовых влагалищ и ПА в зерне (рисунок). Антоциановая пигментация в основаниях листовых влагалищ выявлялась у всех исследуемых мутантов и исходных сортов. Зерна сортов 'Secobra18193', 'Grit', 'Zenit', 'Arena' после 8-часовой обработки 1 н. раствором NaOH с 0,01% TritonX приобретали коричневую окраску, что свидетельствует о наличии в них ПА, тогда как зерна мутантных образцов, полученных на основе этих сортов, оставались желтыми, что указывает на отсутствие этих соединений. При этом

отмечено, что некоторые из протестированных зерен мутантов по локусу *Ant26* имели повреждения, которые также окрашивались в коричневый цвет.

Таким образом, все проанализированные мутанты имеют фенотип, описанный для них ранее.

Показатели роста

Для определения влияния мутаций в локусах *Ant*, контролирующих синтез ПА в зерне, на рост и развитие растений ячменя оценили и сравнили ростовые параметры у взрослых растений сортов ячменя, синтезирующих ПА в зерне, и полученных на их основе беспротоантоциановых мутантов (табл. 2).

Локус *Ant25*

Мутанты *ant25.264* имели значимо меньшую массу корней, побегов, зерна, меньшее количество боковых побегов и индекс урожая по сравнению с исходным сортом 'Secobra18193'. Масса корней и побегов у мутантов была снижена соответственно на 29% и 28% по сравнению с сортом 'Secobra18193' (0,12 vs 0,17 г; 14,54 vs 20,27 г), количество боковых побегов – на 30% (11,60 vs 16,67 шт.), масса зерна – на 41% (4,78 vs 8,12 г), индекс урожая – на 18% (0,23 vs 0,28). По длине главного побега мутантные растения не отличались от сорта 'Secobra18193' (79,8 vs 79,75 см).

Локус *Ant26*

Мутанты по локусу *Ant26* не отличались от исходного сорта 'Grit' по изучаемым параметрам, за исключением *ant26.486*, имевшего большую длину корней по сравнению с контролем. Масса зерен у мутантов варьировала от 3,29 до 4,94 г, причем наименьшее значение зафиксировано у *ant26.485*, а наибольшее – у *ant26.483*; у сорта 'Grit' она составила 3,48 г. Индекс урожая варьировал от 0,26 у мутанта *ant26.483* и сорта 'Grit' до 0,29 у мутантов *ant26.2002* и *ant26.2004*. Среднее количество боковых побегов на растение у мутантов составило 9,46–14,92 шт. с наименьшим значением у *ant26.2004* и наибольшим – у *ant26.486*; у растений сорта 'Grit' этот показатель составил 11,18 шт. Масса побегов у мутантов составила 8,39–12,60 г с наименьшим значением у *ant26.485* и наибольшим – у *ant26.486*; у растений сорта 'Grit' масса побегов составила 9,69 г. Масса корней у мутантов варьировала от 0,14 до 0,20 г с наименьшим значением у мутанта *ant26.2004* и наибольшим – у *ant26.483*; у сорта 'Grit' масса корней составила 0,15 г. Масса корней у мутанта *ant26.486* составила 0,24 г, что было на 60% больше, чем у растений исходного родительского сорта.

Локус *Ant27*

Растения мутанта *ant27.488* по всем анализируемым признакам имели значимо меньшие показатели, чем растения сорта 'Zenit'. Масса корней и побегов у мутанта *ant27.488* была снижена на 55 и 61% соответственно по сравнению с сортом 'Zenit' (0,19 vs 0,42 г; 10,9 vs 27,66 г), длина главного побега – на 19% (90,68 vs 111,68 см), количество боковых побегов – на 44% (14,77 vs 26,52 шт.), масса зерен – на 73% (2,16 vs 8,09 г), индекс урожая – на 40,91% (0,13 vs 0,22).

Растения мутанта *ant27.2043* значимо отличались от растений сорта 'Arena' по длине главного побега, массе зерен и индексу урожая. Высота растений мутанта *ant27.2043* была меньше на 15% по сравнению с сортом 'Arena' (85 vs 100,37 см), масса зерен – на 41% (3,95 vs 6,74 г), индекс урожая – на 31% (0,18 vs 0,26). Масса корней и побегов значимо не различалась между мутантом *ant27.2043* и сортом 'Arena' (0,26 vs 0,23 г; 16,53 vs 18,38 г). Также значимых различий между ними не было выявлено по количеству боковых побегов (24,14 vs 20,21 шт.).

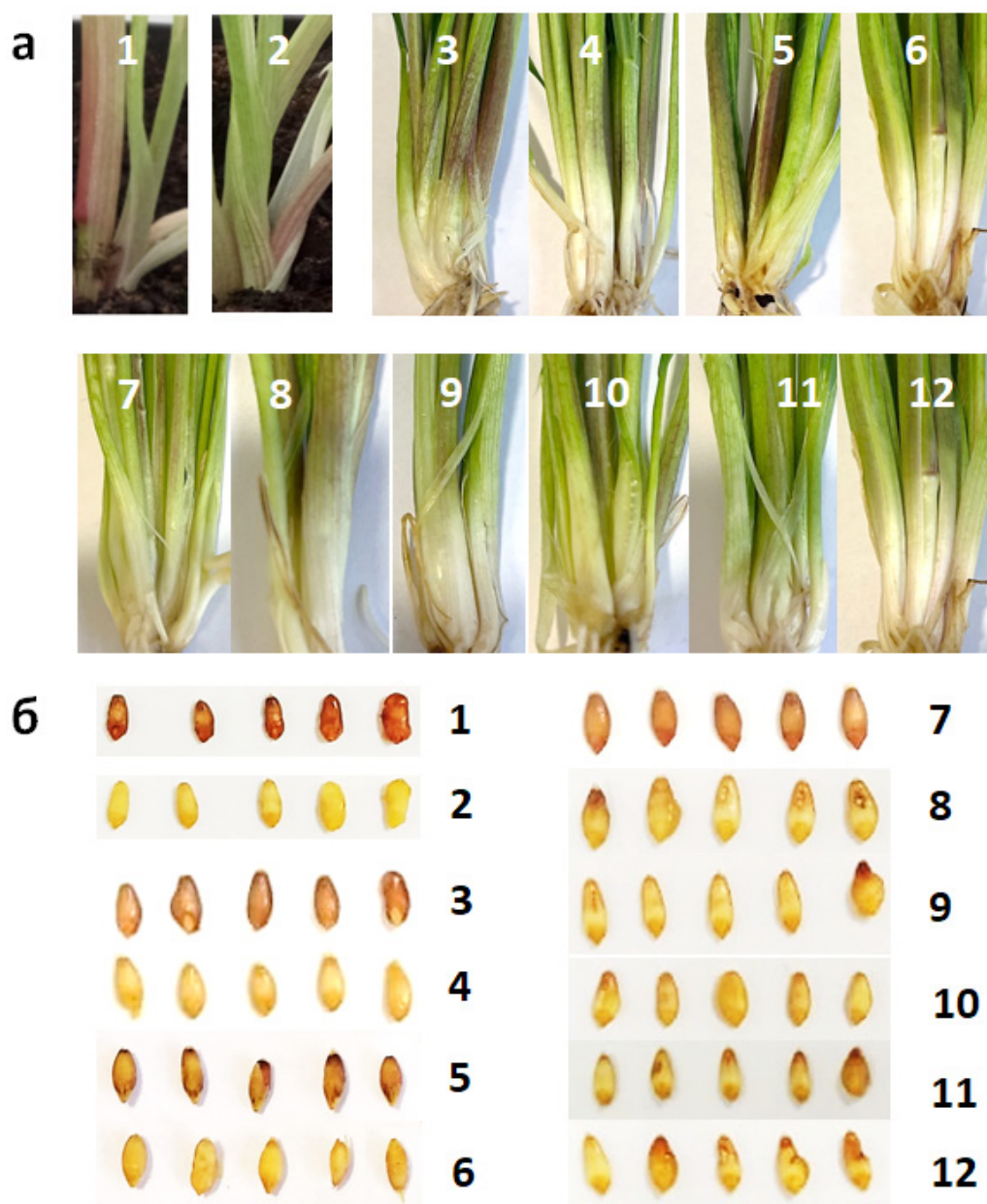


Рисунок. Фенотип мутантов ячменя по локусам *Ant25*, *Ant26*, *Ant27* и их родительских сортов: а – основания листовых влагалищ; б – зерна после их тестирования на наличие проантоцианидинов; 'Secobra18193' (1); *ant25.254* (2); 'Zenit' (3); *ant27.488* (4); Arena (5); *ant27.2043* (6); 'Grit' (7); *ant26.483* (8); *ant26.485* (9); *ant26.486* (10); *ant26.2002* (11); *ant26.2004* (12)

Figure. Leaf sheath bases (a) and seeds after testing for proanthocyanidins (б) of proanthocyanidin-free barley mutants at the *Ant25*, *Ant26* and *Ant27* loci and their parental cultivars: 'Secobra18193' (1); *ant25.254* (2); 'Zenit' (3); *ant27.488* (4); Arena (5); *ant27.2043* (6); 'Grit' (7); *ant26.483* (8); *ant26.485* (9); *ant26.486* (10); *ant26.2002* (11); *ant26.2004* (12)

Таблица 2. Фенотипические показатели мутантов и исходных сортов ячменя
(данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка)

Table 2. Phenotypic characteristics of barley mutants and original cultivars
(the data are presented as the mean $\pm$ the standard error)

Образцы / Samples	Масса кор- ня, г / Root weight, g	Масса побе- гов, г / Shoot weight, g	Длина главно- го побега, см / Main shoot length, cm	Количество боковых побе- гов, шт. / Num- ber of lateral shoots, pcs.	Масса зерен, г / Grain weight, g	Индекс уро- жая / Harvest index
Secobra18193	0,17 $\pm$ 0,018	20,27 $\pm$ 1,371	79,75 $\pm$ 1,498	16,67 $\pm$ 1,339	8,12 $\pm$ 0,570	0,28 $\pm$ 0,005
ant25.264	0,12 $\pm$ 0,016*	14,54 $\pm$ 2,077*	79,8 $\pm$ 1,999	11,60 $\pm$ 1,821*	4,78 $\pm$ 1,030*	0,23 $\pm$ 0,020*
Grit	0,15 $\pm$ 0,03 ^a	9,69 $\pm$ 1,809 ^{ab}	90,0 $\pm$ 2,981 ^{ab}	11,18 $\pm$ 1,91 ^{ab}	3,48 $\pm$ 0,715 ^{ab}	0,26 $\pm$ 0,013 ^{abc}
ant26.483	0,20 $\pm$ 0,058 ^a	10,78 $\pm$ 1,581 ^{ab}	95,17 $\pm$ 1,632 ^{ab}	11,92 $\pm$ 2,234 ^{ab}	3,88 $\pm$ 0,535 ^{ab}	0,26 $\pm$ 0,011 ^a
ant26.485	0,16 $\pm$ 0,016 ^a	8,39 $\pm$ 0,936 ^a	92,58 $\pm$ 0,609 ^a	13,33 $\pm$ 1,597 ^a	3,29 $\pm$ 0,398 ^a	0,28 $\pm$ 0,005 ^{ac}
ant26.486	0,24 $\pm$ 0,029 ^b	12,60 $\pm$ 1,421 ^b	96,08 $\pm$ 1,730 ^b	14,92 $\pm$ 2,608 ^{ab}	4,94 $\pm$ 0,559 ^b	0,28 $\pm$ 0,008 ^{abc}
ant26.2002	0,18 $\pm$ 0,030 ^{ab}	10,10 $\pm$ 1,142 ^{ab}	96,46 $\pm$ 2,625 ^b	11,62 $\pm$ 1,457 ^{ab}	4,10 $\pm$ 0,418 ^b	0,29 $\pm$ 0,006 ^b
ant26.2004	0,14 $\pm$ 0,016 ^a	9,31 $\pm$ 0,849 ^a	96,15 $\pm$ 0,854 ^b	9,46 $\pm$ 1,185 ^b	3,77 $\pm$ 0,311 ^{ab}	0,29 $\pm$ 0,006 ^{bc}
Zenit	0,42 $\pm$ 0,061	27,66 $\pm$ 2,894	111,68 $\pm$ 0,867	26,52 $\pm$ 3,664	8,09 $\pm$ 0,874	0,22 $\pm$ 0,008
ant27.488	0,19 $\pm$ 0,037 [@]	10,9 $\pm$ 1,893 [@]	90,68 $\pm$ 1,014 [@]	14,77 $\pm$ 2,464 [@]	2,16 $\pm$ 0,671 [@]	0,13 $\pm$ 0,017 [@]
Arena	0,23 $\pm$ 0,050	18,38 $\pm$ 2,624	100,37 $\pm$ 1,122	20,21 $\pm$ 2,353	6,74 $\pm$ 1,171	0,26 $\pm$ 0,005
ant27.2043	0,26 $\pm$ 0,032	16,53 $\pm$ 1,694	85,0 $\pm$ 4,072 [#]	24,14 $\pm$ 2,153	3,95 $\pm$ 0,482 [#]	0,18 $\pm$ 0,008 [#]

Примечание: * – достоверные различия между сортом 'Secobra 18193' и мутантом *ant25.264*; ^{abc} – одинаковыми надстрочными буквами отмечены образцы из группы мутантов по локусу *Ant26*, достоверно не отличающиеся друг от друга, разными – образцы, между которыми были выявлены достоверные отличия; [@] – достоверные различия между сортом 'Zenit' и мутантом *ant27.488*; [#] – достоверные различия между сортом 'Arena' и мутантом *ant27.2043*

Note: * – significant differences between cv. 'Secobra18193' and the *ant25.264* mutant; ^{abc} – identical superscript letters indicate the samples from the group of *Ant26* mutants that are not significantly different from each other, while different letters indicate the samples with significant differences identified between them; [@] – significant differences between cv. 'Zenit' and the *ant27.488* mutant; [#] – significant differences between cv. 'Arena' and the *ant27.2043* mutant

Обсуждение

Как показало проведенное исследование, мутации в локусах *Ant25* и *Ant27* не только приводят к отсутствию ПА в зерне, но также негативно влияют на показатели роста растений, в отличие от мутаций в локусе *Ant26*, которые не влияют на рост и развитие растений.

В ранее проведенных исследованиях также наблюдали негативное влияние мутаций в генах синтеза флавоноидов на рост и развитие растений (Von Wettstein et al., 1977; Von Wettstein, 2007). Однако молекулярные механизмы, обуславливающие снижение ростовых параметров у мутантов по разным *Ant*-локусам, различны. Как известно, синтез флавоноидов контролируется у растений структурными генами, кодирующими ферменты метаболического пути, и регуляторными генами, регулирующими экспрессию структурных генов (Adzhieva et al., 2015). Если мутации, обуславливающие нарушение синтеза флавоноидов, произошли в структурном гене, то путь биосинтеза прерывается на веществе, являющемся субстратом фермента, кодируемого этим геном. Биохимический анализ таких мутантов позволил выявить нарушения в ферментативной активности и определить таким образом молекулярные функции *Ant*-локусов.

Так, повышенное накопление дигидрокверцетина у мутантов по локусу *Ant18* позволило установить, что

данный локус кодирует дигидрофлавонол-4-редуктазу (DFR), катализирующую реакцию восстановления дигидрофлавонолов до соответствующих флаван-3,4-диолов (Kristiansen, 1984). Накопление у мутантов по локусам *Ant17* и *Ant22* нехарактерных для ячменя дикого типа производных трицина и хризоеврола (Nakano et al., 2011), а у мутантов по локусу *Ant30* – изосалипурпозиды (Reuber et al., 1997) свидетельствует о прерывании пути биосинтеза в первом случае на нарингенине, а во втором – 4,2',4',6'-тетрагидроксихалконе. Перечисленные вещества являются субстратами флаванон-3-гидроксилазы (F3H) и халконфлаванонизомеразы (CHI), которые кодируются указанными локусами (Druka et al., 2003; Himi, Takeda, 2015).

Как видно из приведенных примеров, несмотря на то что все мутанты по локусам *Ant* характеризуются отсутствием конечных продуктов биосинтеза – ПА и/или антоцианов, они имеют различные профили флавоноидных соединений, при этом образуемые у мутантов в избыточном количестве промежуточные либо нехарактерные для дикого типа соединения обладают разной биологической активностью. Так, при изучении устойчивости мутантов *ant13.152*, *ant17.148*, *ant18.159*, *ant22.1508*, *ant25.264*, *ant26.485*, *ant27.489*, *ant28.484* и *ant29.2110* к грибам из рода *Fusarium* было установлено токсическое действие на данные патогены дигидрокверцетина, на-

капливаемого в избытке в зерне мутанта по локусу *Ant18* (Skadhauge et al., 1997).

Мутации в регуляторных генах приводят к отсутствию или снижению содержания флавоноидных соединений, включая антоцианы, ПА и их предшественников, что обуславливает пониженную адаптацию растений. К примеру, мутации в локусе *Ant13*, кодирующем регуляторный белок WD40, который совместно с транскрипционными факторами bHLH и R2R3-MYB активирует транскрипцию структурных генов биосинтеза флавоноидов, помимо отмеченной выше неустойчивости к фузариозу, обуславливали пониженную скорость роста корней и листьев у растений (Shoeva et al., 2023). Беспроантоцианидиновые селекционные линии, полученные на основе мутанта *ant13*, характеризовались пониженной на 20–25% урожайностью по сравнению с родительским сортом 'Foma' (Von Wettstein et al., 1977; Von Wettstein, 2007).

Снижение ростовых параметров у мутантов может происходить не только из-за уменьшения концентрации флавоноидных соединений, но и по причине нарушений в других физиологических процессах, в контроле которых участвуют мутированные гены. Так, показано, что ген *TTG1* арабидопсиса, кодирующий WD40, помимо регуляции синтеза флавоноидов, также участвует в регуляции образования трихом и корневых волосков (Walker et al., 1999; Ramsay, Glover, 2005). Кроме этого, ухудшение роста и развития мутантных растений по сравнению с родительскими образцами может быть связано с мутациями в генах, не связанных с синтезом ПА. По оценкам, частота возникновения мутаций в геноме ячменя при использовании азида натрия достигает 1/374 тпн, что составляет 15 тысяч мутаций на геном (Talamè et al., 2008).

Наблюдаемое снижение параметров роста у мутанта *ant25.264* по сравнению с сортом 'Secobra18193' предполагает, что кодируемый локусом *Ant25* белок является регуляторным и, помимо участия в образовании ПА, также контролирует развитие растений. Ранее регуляторную функцию данного локуса в синтезе ПА также предполагали на основе биохимического анализа, который выявил снижение содержания катехина и ПА в зерне и ферментативной активности DFR и лейкоантоцианидинредуктазы (LCR), полностью отсутствовавшей у мутантов (Jende-Strid, 1993). Полученные в ходе проведенного исследования данные указывают, что мутация в локусе *Ant25* может иметь плеiotропное влияние на развитие растений, однако нельзя исключать, что причинами наблюдаемого угнетения роста могут быть мутации в других генах, не связанных с синтезом ПА. Анализ роста и развития дополнительных независимых мутантов по данному локусу позволит уточнить его влияние на развитие растений.

По локусу *Ant27* в работе были проанализированы два мутанта. Оба имели пониженные показатели длины главного побега, массы зерен с растения и индекса урожая по сравнению с их исходными сортами, тогда как другие параметры были снижены у мутанта *ant27.488* и не отличались от исходного сорта у мутанта *ant27.2043*. Ранее биохимический анализ выявил следовое количество катехинов и отсутствие ПА в зерне мутантов по локусу *Ant27*, а также сниженную ферментативную активность DFR и LCR, на основании чего было сделано предположение, что данный локус является регуляторным (Jende-Strid, 1993). Поскольку снижение показателей роста было отмечено у двух независимо полученных мутантов, наиболее вероятным является то, что плеio-

тропное влияние на развитие растений имеет локус *Ant27*, а не дополнительные мутации, которые могли произойти в генах, не связанных с синтезом флавоноидов, но участвующих в развитии растений.

По локусу *Ant26* были проанализированы пять независимых мутантов. Как было показано ранее, мутанты по данному локусу синтезируют антоцианы, катехины и имеют ферментативную активность DFR и LCR, сходную с диким типом, однако у них отсутствуют ПА в зерне. На этом основании сделали предположение, что локус *Ant26* кодирует фермент, катализирующий полимеризацию катехинов в ПА (Jende-Strid, 1993). Ни у одного из проанализированных в данном исследовании мутантов не наблюдалось снижения ростовых параметров по сравнению с родительским сортом 'Grit'. Из этого следует, что мутация, скорее всего, действительно затронула фермент, катализирующий заключительные этапы синтеза ПА, либо ген, кодирующий регуляторный фактор, контролирующий его экспрессию, но при этом не оказывающий плеiotропного влияния на развитие растений. Другие мутации, которые могли бы появиться под действием мутагена, либо отсутствуют, либо являются нейтральными.

Заключение

В ходе проведенного исследования было установлено различное влияние мутаций в локусах *Ant25*, *Ant26*, *Ant27* на рост и развитие растений. Отсутствие негативного влияния мутаций в локусе *Ant26* на развитие растений делает мутанты по данному локусу перспективными донорами для селекции высокоурожайных беспроантоцианидиновых сортов ячменя. Кроме этого, полученные данные позволили сделать предположения о молекулярных функциях анализируемых локусов, ценные для дальнейшей верификации генов-кандидатов для данных локусов.

References / Литература

- Abeynayake S.W., Panter S., Mouradov A., Spangenberg G. A high-resolution method for the localization of proanthocyanidins in plant tissues. *Plant Methods*. 2011;7(1):13. DOI: 10.1186/1746-4811-7-13
- Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(5):561-573. [in Russian] (Аджиева В.Ф., Бабак О.Г., Шоева О.Ю., Кильчевский А.В., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(5):561-573). DOI: 10.18699/VJ15.073
- Druka A., Kudrna D., Rostoks N., Brueggeman R., von Wettstein D., Kleinhofs A. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping. *Gene*. 2003;302(1-2):171-178. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)01105-8
- Hay R.K.M. Harvest index: a review of its use in plant breeding and crop physiology. *Annals of Applied Biology*. 1995;126(1):197-216. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1995.tb05015.x
- Himi E., Taketa S. Barley *Ant17*, encoding flavanone 3-hydroxylase (F3H), is a promising target locus for attaining anthocyanin/proanthocyanidin-free plants without pleiotropic reduction of grain dormancy. *Genome*. 2015;58(1):43-53. DOI: 10.1139/gen-2014-0189

- Himi E., Yamashita Y., Haruyama N., Yanagisawa T., Mae-kawa M., Taketa S. *Ant28* gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3 MYB domain protein (*Hvmyb10*) highly affects grain dormancy in barley. *Euphytica*. 2012;188(1):141-151. DOI: 10.1007/s10681-011-0552-5
- Huang Q., Liu X., Zhao G., Hu T., Wang Y. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*. 2018;4(2):137-150. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.004
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas*. 1993;119(2):187-204. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1993.00187.x
- Kristiansen K.N. Biosynthesis of proanthocyanidins in barley: Genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidins. *Carlsberg Research Communications*. 1984;49:503. DOI: 10.1007/BF02907552
- Kumar K., Sinha R.R.K., Kumar S., Nirala R.K., Kumari S., Sahu S.P. Significance of tannins as an alternative to antibiotic growth promoters in poultry production. *The Pharma Innovation Journal*. 2022;11(11):1435-1440.
- Lam L.P.Y., Wang L., Lui A., Liu H., Umezawa T., Tobimatsu Y. et al. Flavonoids in major cereal grasses: distribution, functions, biosynthesis, and applications. *Phytochemistry Reviews*. 2023;22(5):1399-1438. DOI: 10.1007/s11101-023-09873-0
- Lee M.J., Kim Y.K., Kim K.H., Seo W.D., Kang H.J., Park J.C. et al. Quality characteristics and development of naked waxy barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar "Yeongbaekchal" without discoloration of cooked barley. *Korean Journal of Breeding Science*. 2016;48(4):529-534. DOI: 10.9787/KJBS.2016.48.4.529
- Loskutov I.G., Kovaleva O.N., Blinova E.V. Guidelines for the study and preservation of the world collection of barley and oats (Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu i sokhraneniyyu mirovoy kollektsii yachmenya i ovsa). St. Petersburg: VIR; 2012. [in Russian] (Лоскутов И.Г., Ковалева О.Н., Блинова Е.В. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса. Санкт-Петербург: ВИР; 2012).
- Lundqvist U. Scandinavian mutation research in barley – a historical review. *Hereditas*. 2014;151(6):123-131. DOI: 10.1111/hrd2.00077
- Nakano H., Kawada N., Yoshida M., Ono H., Iwaura R., Tonooka T. Isolation and identification of flavonoids accumulated in proanthocyanidin-free barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(17):9581-9587. DOI: 10.1021/jf2019819
- Nyamambi B., Ndlovu L.R., Read J.S., Reed J.D. The effects of sorghum proanthocyanidins on digestive enzyme activity *in vitro* and in the digestive tract of chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(15):2223-2231. DOI: 10.1002/1097-0010(200012)80:15<2223::AID-JSFA768>3.0.CO;2-I
- Ramsay N.A., Glover B.J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant Science*. 2005;10(2):63-70. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.12.011
- Reuber S., Jende-Strid B., Wray V., Weissenböck G. Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase *Physiolgia Plantarum*. 1997;101(4):827-832. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01070.x
- Talamè V., Bovina R., Sanguineti M.C. Tuberosa R., Lundqvist U., Salvi S. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnology Journal*. 2008;6(5):477-485. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00341.x
- Shoeva O.Yu. The world experience of malting barley cultivars breeding based on proanthocyanidin-free mutants. *Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):23-33. [in Russian] (Шоева О.Ю. Мировой опыт создания пивоваренных сортов ячменя на основе беспроантоцианидиновых мутантов. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):23-33). DOI: 10.18699/LettersVJ2021-7-04
- Shoeva O.Yu., Mukhanova M.A., Zakhrebekova S., Hansson M. *Ant13* encodes regulatory factor WD40 controlling anthocyanin and proanthocyanidin synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2023;71(18): 6967-6977. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c09051
- Skadhauge B., Thomsen K.K., Von Wettstein D. The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*. 1997;126(2):147-160. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1997.00147.x
- Tonooka T., Kawada N., Yoshida M., Yoshioka T., Oda S., Hatta K. et al. Breeding of a new food barley cultivar "Shiratae Nijo" exhibiting no after-cooking discoloration. *Breeding Science*. 2010;60(2):172-176. DOI: 10.1270/jsbbs.60.172
- Von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58:1-19. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003
- Von Wettstein D., Jende-Strid B., Ahrenst-Larsen B., Sorensen J.A. Biochemical mutant in barley renders chemical stabilization of beer superfluous. *Carlsberg Research Communications*. 1977;42:341-351. DOI: 10.1007/BF02906119
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L. et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*. 1999;11(7):1337-1349. DOI: 10.1105/tpc.11.7.1337
- Xie P., Shi J., Tang S., Chen C., Khan A., Zhang F. et al. Control of bird feeding behavior by Tannin1 through modulating the biosynthesis of polyphenols and fatty acid-derived volatiles in sorghum. *Molecular Plant*. 2019;12(10):1315-1324. DOI: 10.1016/j.molp.2019.08.004
- Yanagisawa T., Nagamine T., Takahashi A., Takayama T., Doi Y., Matsunaka H. et al. Breeding of Kirari-mochi: A new two-rowed waxy hull-less barley cultivar with superior quality characteristics. *Breeding Science*. 2011;61(3):307-310. DOI: 10.1270/jsbbs.61.307
- Yu D., Huang T., Tian B., Zhan J. Advances in biosynthesis and biological functions of proanthocyanidins in horticultural plants. *Foods*. 2020;9(12):1774. DOI: 10.3390/foods9121774

Информация об авторах

Игорь Васильевич Тощий, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, totsky@g.nsu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5565-9097>

Ли Жуйсюань, студент магистратуры, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 1, z.li2@g.nsu.ru

Олеся Юрьевна Шоева, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, старший преподаватель, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 1, olesya_ter@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5289-8631>

Information about the authors

Igor V. Totsky, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Akademika Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090 Russia, totsky@g.nsu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5565-9097>

Li Ruixuan, M. Sc. student, Novosibirsk State University, 1 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia, z.li2@g.nsu.ru

Olesya Yu. Shoeva, Cand. Sci. (Biology), Head of a Laboratory, Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Akademika Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090 Russia, Senior Lecturer, Novosibirsk State University, 1 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia, olesya_ter@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5289-8631>

Вклад авторов: Тоцкий И. В. – измерения морфометрических параметров растений ячменя; анализ полученных данных; подготовка черновика рукописи. Ли Ж. – участие в измерении морфометрических параметров растений ячменя. Шоева О. Ю. – инициация исследования; общее руководство работой; оценка фенотипа растений; редактирование чернового варианта рукописи.

Contribution of the authors: Totsky I. V. – measurement of morphometric parameters of barley plants; data analysis; preparation of the draft manuscript. Li R. – participation in the measurement of morphometric parameters of barley plants. Shoeva O. Yu. – initiation of the study; general supervision of the work; assessment of the plant phenotype; revision of the draft manuscript.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила в редакцию 27.02.2024; одобрена после рецензирования 06.05.2024; принята к публикации 05.06.2024. The article was submitted on 27.02.2024; approved after reviewing on 06.05.2024; accepted for publication on 05.06.2024.