

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11

Оригинальное исследование

## Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок

Е.И. Гордеева<sup>1</sup> ✉, О.Ю. Шоева <sup>1</sup>, В.П. Шаманин <sup>2</sup>, Е.К. Хлесткина <sup>1,3</sup>

**Аннотация:** Для ускорения получения новых сортов мягкой пшеницы, накапливающих антоциановые соединения в зерне, ранее нами разработаны внутригенные ДНК-маркеры к регуляторным генам *Pp* и *Ba*, контролирующим биосинтез антоцианов в перикарпе и алейроновом слое зерновки соответственно. В настоящей работе эти маркеры совместно со сцепленными с целевыми микросателлитными маркерами апробированы при создании линий мягкой пшеницы на основе сорта Элемент 22 и селекционной линии BW49880, накапливающих антоцианы в перикарпе, алейроне и в обоих перечисленных слоях зерновки одновременно. В качестве доноров антоциановой пигментации использованы изогенные линии с окрашенными зерновками, созданные ранее на генетическом фоне сорта Саратовская 29. Оценено суммарное содержание антоцианов в цельнозерновой муке данных линий. Этот показатель зависел от генотипа, увеличиваясь в ряду: краснозерный < фиолетовозерный < голубозерный < чернозерный; за исключением фиолетовозерной линии, полученной на основе BW49880 (накапливающей одновременно Zn) и достоверно не отличавшейся от чернозерных линий. Обсуждается применение полученных линий в качестве перспективных доноров генов биосинтеза антоцианов для создания новых сортов пшеницы с повышенным содержанием антоцианов.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница; антоцианы; селекция; молекулярные маркеры.

**Для цитирования:** Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):86-99. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11

**Благодарности:** Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦИГ СО РАН FWN-2022-0017 и Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-534 от 28.05.2021).

Original article

## The molecular markers applying in breeding of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with different anthocyanin coloration of the grains

Е.И. Gordeeva<sup>1</sup> ✉, O.Y. Shoeva <sup>1</sup>, V.P. Shamanin <sup>2</sup>, E.K. Khlestkina <sup>1,3</sup>

**Abstract:** To accelerate breeding new varieties of bread wheat that accumulate anthocyanins in grain, we have previously developed intragenic DNA markers to the regulatory genes *Pp* and *Ba* controlling anthocyanin biosynthesis in pericarp and aleurone layer of grain, respectively. In the current work these markers together with the linked microsatellite markers were tested in creation of bread wheat lines, accumulating anthocyanins in the pericarp, aleurone, and in both of these grain layers simultaneously, based on variety Element 22 and breeding line BW49880. The isogenic lines with colored grains created earlier on the genetic background of variety Saratovskaya 29 were used as donors of anthocyanin pigmentation. The total anthocyanin content in whole grain flour extracts of fifteen lines, differing in the color of the grain, was estimated. This index depended on the genotype, increasing in the series: red-grain < purple-

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия  
P.A. Stolypin Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия  
N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 elgordeeva@bionet.nsc.ru

 © Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К., 2023

grain < blue-grain < black-grain; with the exception of purple-grain line obtained based on BW49880 (accumulating Zn at the same time) and did not differ significantly from the black-grain lines. The paper discusses promising donors of anthocyanin biosynthesis genes for the creation of new anthocyanin-rich wheat varieties. The usage of the obtained lines as promising anthocyanin biosynthesis gene donors for creating new anthocyanin-rich wheat varieties is discussed.

**Key words:** spring bread wheat; anthocyanins; breeding; molecular markers.

**For citation:** Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Shamanin V.P., Khlestkina E.K. The molecular markers applying in breeding of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with different anthocyanin coloration of the grains. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(2):86-99. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11 (in Russian)

## Введение

Антоцианы – растительные полифенольные пигменты, накапливающиеся в вегетативных и генеративных органах растений и выполняющие защитные функции в условиях биотического и абиотического стрессов (Хлесткина и др., 2012, Landi, 2015). Адаптационные свойства этих соединений связаны в первую очередь с их высокой антиоксидантной активностью благодаря наличию реакционноспособных гидроксильных групп, способности к реакциям метилирования, метаксилирования, алкилирования, гликозилирования и хелатирования металлов переменной валентности – Fe, Zn, Mn, Cu (Запрометов, 1993). В настоящее время доказана польза антоцианов для здоровья человека (Юдина и др., 2021; Dwivedi et al., 2022).

Мягкую пшеницу (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 42$ , геном BBAADD) в последнее время все чаще рассматривают в качестве функционального пищевого продукта, выступающего источником не только простых и сложных углеводов, а также белков, пищевых волокон, минералов и различных фенольных соединений, среди которых выделяется группа антоциановых соединений (Wang et al., 2020). В зерновках мягкой пшеницы антоциановые соединения могут накапливаться в перикарпе (плодовой оболочке) и алейроновом слое эндосперма.

Гены, определяющие антоциановую пигментацию различных органов растений пшеницы, картированы, и их белковые продукты идентифицированы как транскрипционные факторы, относящиеся к R2R3-MYB, bHLH и WD40, которые объединяются в комплекс MYB – bHLH – WD (MBW), регулирующий экспрессию структурных генов, кодирующих ферменты метаболического пути биосинтеза антоцианов (Lap, 2021).

Биосинтез антоцианов в перикарпе происходит под контролем трех комплементарных взаимодействующих генов *Pp* (*Purple pericarp* – пурпурный околоплодник) (Zeven, 1991). Ранее с помощью моносомного анализа гены *Pp* были локализованы на хромосомах 7B (*Pp1*), 6A (*Pp2*) и 2A (*Pp3*) (Arbuzova et al., 1998; Arbuzova, Maystrenko, 2000). Продукт гена *Pp2* белок WD40 является универсальным фактором широкого спектра действия, аллельного полиморфизма этого гена не выявлено (Стрыгина, Хлесткина, 2019). Ключевой ген *Pp3*, картированный на хромосоме 2A, и минимум один из трех гомеологичных генов *Pp-1*, картированных на хромосомах 7-й гомеологической группы, совместно запускают биосинтез антоцианов и их накопление в перикарпе зерновок пшеницы (Хлесткина и др., 2014).

В геноме мягкой пшеницы установлена нуклеотидная последовательность гена *TaMyc1* (синоним *Pp3*), показана его

тканеспецифическая транскрипционная активность в окрашенном перикарпе зерновок (Shoeva et al., 2014). Данный ген кодирует транскрипционный фактор с доменом bHLH и ортологичен генам *Lc* и *Rb*, определяющим, соответственно, антоциановую окраску зерна кукурузы и риса (Ludwig et al., 1989; Wang, Shu, 2007). Выявлено наличие аллелей у гена *TaMyc1*. Показано, что в промоторе данного гена у окрашенных генотипов присутствует шесть tandemных повторов длиной 261 нуклеотид каждый (аллель *TaMyc1p*), тогда как у неокрашенных сортов обнаружен один такой повтор (*TaMyc1w*) (Zong et al., 2017; Jiang et al., 2018). Присутствие доминантного аллеля *TaMyc1p* связано с фиолетовой окраской зерновок не только у 15 исследованных сортов мягкой пшеницы, но также у образцов тетраплоидных пшениц *T. durum*, *T. polanicum*, *T. turgidum*, собранных в Эфиопии и Эритрее (Zong et al., 2017).

Второй ген *Pp-1*, необходимый для формирования признака фиолетовой окраски зерна, был длительное время неизвестен. С помощью сегрегационного анализа установлена его локализация в кластере генов, контролирующих фиолетовую окраску вегетативных органов: колеоптиле (*Rc* – *Red coleoptile*), стебля (*Pc* – *Purple culm*), листового влагалища (*Pls* – *Purple leaf sheath*), ушек листа (*Ra* – *Red auricles*), чешуй колоса (*Pg* – *Purple glume*) и пыльников (*Pan* – *Purple anthers*) (Хлесткина, 2012). Данный кластер генов локализован на коротком плече хромосом 7-й гомеологической группы с геном *Mpc1* (MYB protein C1), ортологичным гену *C1* кукурузы, который кодирует регуляторный фактор с доменом R2R3-MYB и контролирует окраску вегетативных органов кукурузы (Li et al., 1999; Хлесткина, 2012). Позднее выделены нуклеотидные последовательности гена *TaC1* (синонимы *TaMpc1*, *Rc-1*), контролирующего окраску колеоптиле у пшеницы (Himi, Taketa, 2015). Показано участие этого гена в контроле окраски перикарпа зерна пшеницы (*Rc-1 = Pp-1*) (Jiang et al., 2018; Gordeeva et al., 2020).

В алейроновом слое эндосперма зерновки пшеницы с голубым (сероватым или зеленоватым) фенотипом биосинтез антоцианов контролируют доминантные аллели генов *Ba* (*Blue aleurone*). Эти гены унаследованы мягкой пшеницей от близкородственных видов злаков в ходе межвидовой гибридизации (Zeven, 1991). Гены *Ba* идентифицированы у *Thipopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (синоним *Agropyron elongatum* (Host) Beauv) (*Ba1*; Keppenne, Baenziger, 1990; Zheng et al., 2006), *Th. bessarabicum* (Savul. & Rayss) Á. Löve (*BaThb*; Shen et al., 2013), *T. monococcum* L. (*Ba2*; Dubcovsky et al., 1996), *T. boeoticum* Boiss. (*Ba2*; Singh et al., 2007). У линий мягкой пшеницы с голубой окраской зерна идентифицированы чужеродные транслокации в хромосомах 4-й

гомеологической группы или полное замещение хромосом данной группы (Zeven, 1991; Арбузова и др., 2012; Shen et al., 2013; Gordeeva et al., 2022). В геноме пшеницы, несущей интрогрессию от *Th. ponticum*, выявлена нуклеотидная последовательность гена *ThMyc4E*, контролирующего голубую окраску алейрона. Ген *ThMyc4E* кодирует транскрипционный фактор с доменом bHLH (Li et al., 2017).

Насыщение современных сортов мягкой пшеницы антоцианами возможно за счет переноса генов, контролирующих биосинтез антоцианов, от донорных линий/сортов в рекуррентные сорта с помощью гибридизации. Для повышения точности отбора нами разработаны внутригенные ДНК-маркеры *Pp1-diagnostic*, *Pp3-diagnostic*, *ThMyc4E-specific*, которые успешно использованы при создании набора окрашенных линий на основе сорта Саратовская 29, за исключением *Pp1-diagnostic* (Gordeeva et al., 2022).

Цель работы – апробация разработанных маркеров для генотипирования и создания линий мягкой пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в зерновках на основе сибирского сорта Элемент 22 и перспективной селекционной линии BW49880, а также сравнительное исследование содержания антоцианов в зерновках полученных линий.

## Материалы и методы

### Растительный материал

Для получения набора окрашенных линий мягкой пшеницы в качестве исходных рекуррентных сортов/линий взяты Элемент 22 и BW49880. Элемент 22 является среднепозднеспелым современным сибирским сортом, характеризуется наличием остей, несет ржаную транслокацию 1AL:1RS с генами *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, определяющими его устойчивость к патогенам Западно-Сибирского региона (Шаманин и др., 2020). Селекционная линия BW49880 характеризуется короткостебельностью, среднераннеспелая, имеет белые, с повышенным содержанием цинка зерновки (CIMMYT, <https://wgb.cimmyt.org>). По результатам полевого тестирования в условиях Западной Сибири данная линия показала высокую степень устойчивости к грибным заболеваниям растений пшеницы (Gordeeva et al., 2020).

Проведено скрещивание сорта Элемент 22 и линии BW49880 с фиолетовозерными изогенными линиями *i:S29Pp-D1Pp3<sup>P/PF</sup>* (далее обозначены как *фC29<sup>P/PF</sup>*) и параллельно с голубозерной замещенной линией *s:S29Ba14Th(4D)*, созданными ранее на генетической основе ярового сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 и используемыми в качестве доноров доминантных аллелей генов *Pp-D1*, *Pp3* и *Ba1* соответственно (Arbuzova et al., 1998; Gordeeva et al., 2020, 2022). Отбор новых линий с антоциановым пигментом зерновок проводили в поколениях  $F_2$  и  $BC_1F_2$  после скрещивания и последующего беккросса родительским сортом Элемент 22 и линией BW49880. Отобранные фиолетово- и голубозерные линии скрещены друг с другом для получения чернозерных линий (рис. 1).

В качестве контрольных линий при молекулярном генотипировании использованы изогенные линии *фC29<sup>P</sup>* и *фC29<sup>P/PF</sup>* с интрогрессированными участками различной длины в хромосомы 2A и 7D от сортов Purple (P) и Purple Feed (PF) соответственно, несущих доминантные аллели генов

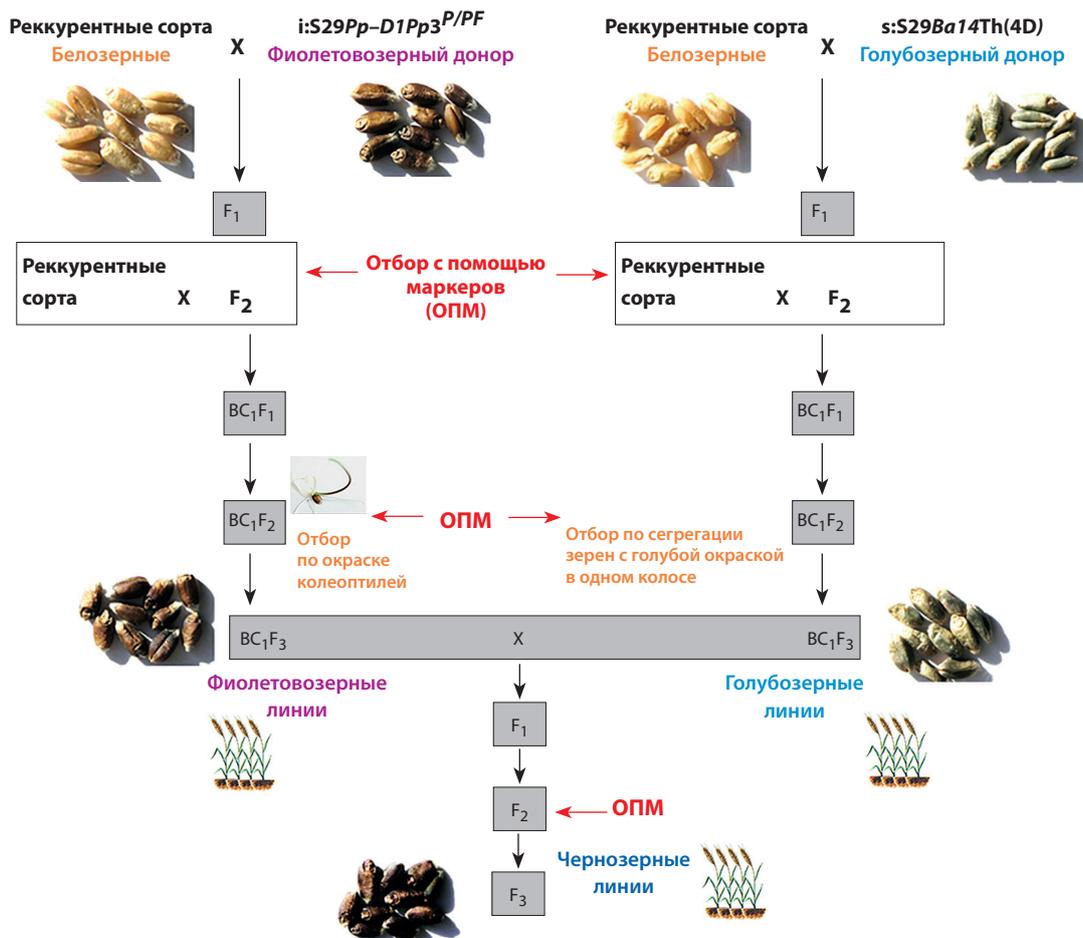
*Pp3* и *Pp-D1*, и сорт Мерора – донор пырейной хромосомы 4Th. Помимо окраски зерновок мы дополнительно контролировали признак «остистость/безостистость» колоса, связанный с наличием доминантного гена *B1* (ингибитора остистости), локализованного на длинном плече хромосомы 5A, у сорта Саратовская 29 (Arbuzova et al., 1998).

### Генотипирование ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев родительских, донорных, контрольных сортов и линии, а также гибридов второго поколения ( $F_2$ ), полученных при выполнении вышеуказанной селекционной схемы согласно ранее описанной методике (Plaschke et al., 1995). Выделенную ДНК диагностировали с помощью ПЦР с использованием внутригенных маркеров *Pp1-diagnostic*, *Pp3-diagnostic*, *ThMyc4E-specific*, разработанных нами к генам биосинтеза антоцианов *Pp-1*, *Pp3*, *Ba1* соответственно и сцепленных с ними полиморфных микросателлитных (SSR, simple sequence repeats) маркеров (табл. 1, Приложение).

Внутригенный маркер *Pp3-diagnostic* позволяет надежно различить доминантные и рецессивные аллели гена *Pp3* (Шоева и др., 2021). Внутригенный маркер *Pp1-diagnostic*, фланкирующий с двух сторон переменный по длине ДНК единственный интрон гена *TaMub1*, показывает наличие доминантного гена *Pp-D1* (*TaMub1*) в интрогрессированном участке хромосомы 7DS. Данный маркер разработан с использованием известных нуклеотидных последовательностей аллелей гена *Rc* (синоним *Pp*) цветных изогенных линий пшеницы на основе сортов Chinese Spring и Новосибирская 67 (Коваль, 1997; Himi, Taketa, 2015). Маркер *ThMyc4E-specific* подтверждает наличие доминантного гена *Ba1* (*ThMyc4E*), локализованного в длинном плече хромосомы пырея 4Th, заместившей после гибридизации хромосому пшеницы 4B или 4D (Гордеева и др., 2022; Gordeeva et al., 2022). Для уточнения замещения хромосом и межсортного наследования хромосомных перестроек также применены SSR-маркеры серии *Xgwm* (Gatersleben Wheat Marker; Röder, 1998).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на выделенной из листьев ДНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл в расчете: на 100 нг ДНК-матрицы (1 мкл) приходилось 67 мМ трис-НСl (рН 8,8), 1,8 мМ  $MgCl_2$ , 0,01 % Tween 20, 18 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , по 0,2 мМ каждого дНТФ, по 0,3 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq. Амплификацию выполняли в T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) по общепринятой методике: предденатурация – 2 мин при 94 °С, 45 циклов (денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг матрицы с праймерами – 1 мин при 53, 55 или 60 °С (см. табл. 1), полимеризация – 2 мин при 72 °С); достраивание ПЦР-фрагментов – 5 мин при 72 °С. Для режима TOCHDOWN после предденатурации, 2 мин при 94 °С, проведены 13 циклов (денатурация – 15 секунд при 94 °С, отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 65 °С с понижением на 0,7 °С (цикл, полимеризация – 45 секунд при 72 °С)); 24 цикла (денатурация – 15 секунд при 94 °С, отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 56 °С, полимеризация – 30 секунд при 72 °С) и стандартное завершение достраиванием ПЦР-фрагментов – 5 мин при 72 °С.



**Рис. 1.** Схема получения фиолетово-, голубо- и чернозерных линий пшеницы  
**Fig. 1.** Scheme of the obtaining purple-, blue- and black-grained wheat lines

Для разделения продуктов ПЦР использовали 2 % агарозный гель (LE Agarose, Lonza Rockland, Inc., Рокленд, Мэн, США) и 5 % HR (High resolution) агарозный гель высокого разрешения NuAgarose™ HR Agarose (ACTGene, Inc., Писка-тауэй, Нью-Джерси, США), приготовленные на TAE-буфере (40мМ Трис-HCl pH 8.0, 20мМ ацетат натрия, 1мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия. По 10–20 мкл реакционной смеси с продуктами ПЦР и добавлением 5 % глицерина, 0.05 % бромфенолового синего и 0.05 % ксиленцианола капали в карманы геля. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использован 100 п.н. (ООО «МЕДИГЕН», Новосибирск, Россия). Электрофорез проходил в горизонтальной камере в течение 1–5 ч при напряжении 7 В/см. Фотографии в УФ-свете и анализ изображения делали с помощью системы документации гелей Molecular Imager® Gel DocTM XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США).

**Оценка суммарного содержания антоцианов в зерновках**  
Двадцать грамм зерна каждой линии перемалывали в лабораторной мельнице ЛЗМ-1 (ООО «Зернотехника», Москва, Россия). Для экстракции антоцианов 1 г цельнозерновой (с отрубями) муки гомогенизировали в 10 мл 1 % раствора HCl в метаноле, встряхивали и инкубировали при 4 °С в

течение 12 ч. После центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 25 мин при 4 °С отбирали супернатант и измеряли плотность содержания антоцианов в растворе в спектрофотометре SmartSpec TM Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) при длине волны 530 и 700 нм. Скорректированное значение ( $A_{530} - A_{700}$ ) использовали для расчета массовой концентрации по эквиваленту ацианидин-3-глюкозида (Cy-3-Glu) в микрограммах на грамм сухой массы материала образца (DW) согласно ранее описанной методике (Abdel-Aal, Hucl, 1999). Каждый образец анализировали в трех биологических повторностях. Для более точной оценки содержания антоцианов в зерновках измеряли массу тысячи зерен каждого образца в трех повторях. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни в программе Statistica 6 (StatSoft, Inc., Талса, Оклахома, США).

## Результаты

### Селекция линий пшеницы с окрашенными зерновками и их генотипирование

С помощью селекционной схемы, представленной на рис. 1, помимо набора линий на основе сорта Саратовская 29 (ли-

**Таблица 1.** Молекулярные маркеры, использованные в настоящей работе  
**Table 1.** Molecular markers used for DNA analysis

Маркер	Локализация в хромосоме	Температура отжига, °С	Структура прямого и обратного праймеров [ссылка]	Размеры продуктов ПЦР, п.н.	
				S29/S29 <sup>P</sup> /S29 <sup>PF</sup>	4Th/4B/4D
<b><i>Pp3-diagnostic</i></b>	2A	Tdn 65–56	5'-AAGAAATGACACTTCGCCACAA-3' 5'-GGTGGGCTCTTCCTGGCAT-3' [патент № 2774444, Шоева и др., 2021]	429/398/398	
<i>Xgwm0294</i>	2A	55	5'-GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG-3' 5'-GCAGAGTGATCAATGCCAGA-3' [Röder et al., 1998]	90/90/102	
<i>Xgwm0312</i>	2A	60	5'-ATCGCATGATGCACGTAGAG-3' 5'-ACATGCATGCCTACCTAATGG-3' [Röder et al., 1998]	198/190/198	
<b><i>Pp1-diagnostic</i></b>	7D	Tdn 65–56	5'-ATGGGGAGGAGGGCGT-3' 5'-TGCCGAGC- GTGCTGTT-3' [данная работа]	478/434/434	–
<i>Xgwm0111</i>	7D	55	5'-TCTGTAGGCTCTCTCCGACTG-3' 5'-ACCTGATCAGATCCCACTCG-3' [Röder et al., 1998]	221/205/198	–
<i>Xgwm0437</i>	7D	50	5'-GATCAAGACTTTTGTATCTCTC-3' 5'-GAT- GTCCAACAGTTAGCTTA-3' [Röder et al., 1998]	100/110/100	
<i>Xgwm1002</i>	7D	60	IPK Gatersleben*	210/170/210	–
<b><i>ThMyc4E</i></b>	4E	Tdn 65–56, 15mMMgCl <sub>2</sub>	5'-GAAACAACAGGACCGAGCAG-3' 5'-CTT- GATGGCGTCAAACACTT-3' [патент № 2790186, Гордеева и др., 2022]	–	198/–/–
<i>Xgwm0251</i>	4B	50	5'-CAACTGGTTGCTACACAAGCA-3' 5'-GGGATGTCTGTTCCATCTTAG-3' [Röder et al., 1998]		–/210/–
<i>Xgwm0375</i>	4B	Tdn	5'-ATTGGCGACTCTAGCATATACG-3' 5'-GGGATGTCTGTTCCATCTTAGC-3' [Korzun et al., 1997]	–	–/180/–
<i>Xgwm0609</i>	4D	50	5'-GCGACATGACCATTTTGTTG-3' 5'-GATAT- TAAATCTCTATGTGTG-3' [Röder et al., 1998]	–	–/–/120
<i>Xgwm0624</i>	4D	53	5'-TTGATATTAATCTCTCTATGTG-3' 5'-AATTTATTGAGCTATGCG-3' [Röder et al., 1998]	–	–/–/120
<i>Xgwm4001</i>	4D	55	IPK Gatersleben*	–	–/–/260

\* Последовательность праймеров можно получить по запросу у доктора М. Рёдера (IPK Gatersleben), структура других маркеров доступна в базе данных GrainGenes (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>, по состоянию на 1 марта 2023 г.).

\* The sequence of the primers is available upon request from Dr. M. Röder (IPK Gatersleben), and the structure of the other markers can be found in the GrainGenes database (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>, accessed March 1, 2023).

нии 1–6), полученных ранее, созданы два новых набора окрашенных линий мягкой пшеницы на основе селекционной линии BW49880 (7–11) и сорта Элемент 22 (12–15) (табл. 2). В ходе отборов помимо оценки окраски колеоптиле, которая свидетельствовала о наличии доминантного аллеля (аллелей) генов *Pp-1*, использованы внутригенные и сцепленные с ними микросателлитные маркеры (см. табл. 1).

С помощью маркера *Pp3-diagnostic* получены ПЦР-продукты длиной 398 и 429 п.н., соответствующие доминантным и рецессивным аллелям гена *Pp3* соответственно

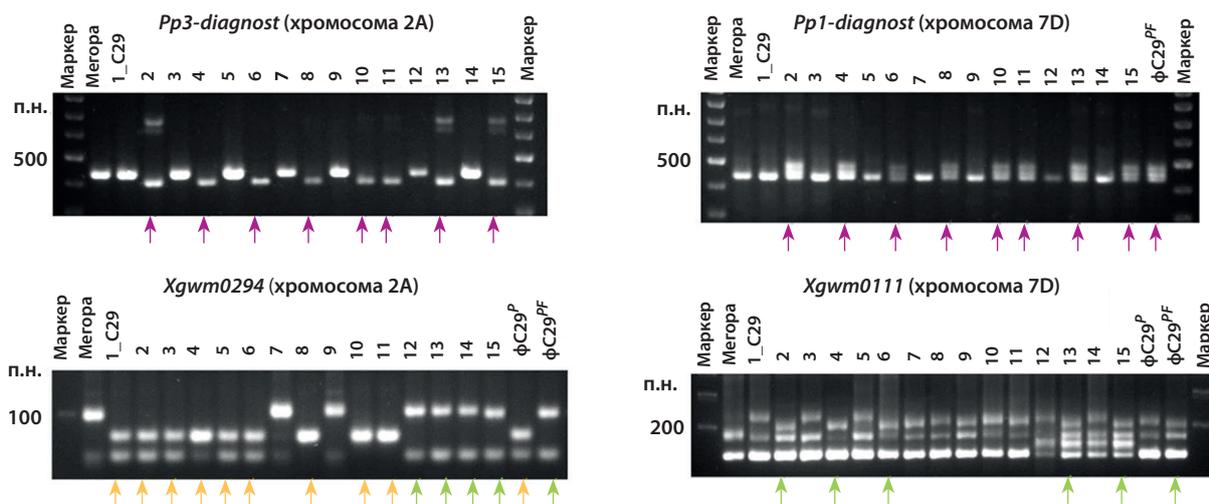
(рис. 2, слева). Микросателлитные маркеры *Xgwm0294* и *Xgwm0312* использовали для диагностики рекомбинантных фрагментов в хромосоме 2A. Стоит отметить, что интрогрессированный участок от сорта Purple короче, чем от Purple Feed (см. Приложение), и диагностические SSR-маркеры в линиях, несущих интрогрессию от сорта Purple, амплифицируют ПЦР-фрагмент, не отличающийся от такового сорта Саратовская 29. Применение маркера *Xgwm0294* совместно с маркером *Pp3-diagnostic* позволило выявить у линий 1–6, созданных на основе Саратовской 29, и линий 8, 10, 11 – на

**Таблица 2.** Образцы пшеницы, изученные в данной работе  
**Table 2.** Wheat sample types used in this study

№	Короткое название	Сорт/линия (полное название)	Краткое описание	Родословная	Оригинатор	Литературный источник
1	C29	Саратовская 29 (cv. Saratovskaya 29, S29)	Краснозерный сорт	Альбидум 24 / Лютеценс 55/11	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов	
2	фC29	i:S29Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup>	Фиолетовозерная изогенная линия Саратовской 29	Саратовская 29 *8 / Purple // Саратовская 29 *8 / Purple Feed	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2022
3	гC29-1	s:S29Ba14Th(4D)	Голубозерная линия Саратовской 29 с заменой хромосомы 4В	i:S29Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup> / s:S29Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2022
4	чC29-1	s:S29Ba14Th(4B) Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup>	Чернозерная линия Саратовской 29 с заменой хромосомы 4В	i:S29Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup> / s:S29Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2022
5	гC29-2	s:S29Ba14Th(4D)	Голубозерная линия Саратовской 29 с заменой хромосомы 4D	Саратовская 29 *7 / Меропа	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2021
6	чC29-2	s:S29Ba14Th(4D) Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup>	Чернозерная линия Саратовской 29 с заменой хромосомы 4D	i:S29Pp3 <sup>P</sup> Pp-D1 <sup>PF</sup> / s:S29Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2022
7	BW	BW49880	Белозерная линия BW49880, остистый колос	Villa Juarez F2009 / Solala // Wbl1 *2 / Brambling	СИММУТ, INT Мексика	<a href="https://wgb.cimmyt.org">https://wgb.cimmyt.org</a>
8	фBW	l:BW49880Pp3Pp-D1 <sup>P</sup>	Фиолетовозерная линия BW49880	BW49880 *2 / i:S29Pp3Pp-D1 <sup>P</sup>	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2020
9	гBW	s:BW49880Ba14Th(4D)	Голубозерная линия BW49880 с заменой хромосомы 4D, безостый колос	BW49880 *2 / s:S29Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Настоящее исследование
10	чBW-1	s:BW49880Ba14Th(4D) Pp3Pp-D1 <sup>P</sup> B1 <sup>S29</sup>	Чернозерная линия BW49880 с заменой хромосомы 4D, безостый колос	l:BW49880Pp3Pp-D1 <sup>P</sup> / l:BW49880Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Настоящее исследование
11	чBW-2	s:BW49880Ba14Th(4D) Pp3Pp-D1 <sup>P</sup>	Чернозерная линия BW49880 с заменой хромосомы 4D, остистый колос	l:BW49880Pp3Pp-D1 <sup>P</sup> / l:BW49880Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Настоящее исследование
12	Эл22	Элемент 22 (cv. Element 22, El22)	Краснозерный сорт, остистый колос	(Гранит / Саратовская 29) // 3 [Эритросперум 59 // (Целинная 20 / Терция)]	Омский ГАУ, Омск	<a href="https://reestr.gossortrf.ru">https://reestr.gossortrf.ru</a>
13	фЭл22	l:El22Pp3Pp-D1 <sup>PF</sup>	Фиолетовозерная линия Элемента 22	Элемент 22 *2 / i:S29Pp3Pp-D1 <sup>PF</sup>	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Gordeeva et al., 2020
14	гЭл22	s:El22Ba14Th(4D)	Голубозерная линия Элемента 22 с заменой хромосомы 4В	Элемент22 *2 / s:S29Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Настоящее исследование
15	чЭл22	s:El22Ba14Th(4D) Pp3Pp-D1 <sup>PF</sup>	Чернозерная линия Элемента 22 с заменой хромосомы 4D 4Th(4D)	l:El22 Pp3Pp-D1 <sup>PF</sup> / s:El22Ba14Th(4D)	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск	Настоящее исследование

Примечание. P – наследственный материал, переданный от сорта донора Purple (к-46990, Австралия), PF – от сорта Purple Feed (к-49426, Канада), 4Th – хромосомы от *Thinopyrum ponticum*, заместившие хромосомы мягкой пшеницы 4В или 4D; l: – линия, i: – изогенная линия, s: – линия с замещенными хромосомами.

Note. P – hereditary material passed down from the donor spring breeding line Purple (k-46990, Australia), PF – the one from the line Purple Feed (k-49426, Canada), 4Th – chromosomes from *Thinopyrum ponticum*, substituted wheat chromosomes 4B or 4D; l: – line; i: – isogenic line, s: – line with substituted chromosomes.



**Рис. 2.** Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с помощью маркеров для диагностики генов *Pp3* и *Pp-D1*, контролирующих фиолетовую окраску зерновки пшеницы

Слева: маркер *Pp3-diagnostic* – фиолетовыми стрелками отмечены продукты ПЦР, соответствующие доминантным аллелям гена *Pp3*; маркер *Xgwm0294* для диагностики интрогрессии – оранжевыми стрелками указаны фрагменты ДНК, наследуемые от фиолетовозерной линии  $\phi C29^P$ , зелеными стрелками – от линии  $\phi C29^{PF}$ . Справа: маркер *Pp1-diagnostic* – фиолетовыми стрелками отмечены продукты ПЦР, соответствующие доминантным аллелям гена *Pp-D1*; маркер *Xgwm0111* для диагностики интрогрессии – зелеными стрелками указаны фрагменты ДНК, наследуемые от фиолетовозерной линии  $\phi C29^{PF}$ . Нумерация линий указана в табл. 2

**Fig. 2.** Electrophoregrams of the PCR products obtained by the markers to diagnosis of the *Pp3* and *Pp-D1* genes, controlling purple color of wheat grains

Left: marker *Pp3-diagnostic* – purple arrows indicate PCR products corresponding to dominant alleles of *Pp3* gene; marker *Xgwm0294* for introgression diagnosis – orange arrows indicate DNA fragments inherited from purple-grained isogenic line  $i:S29^P$ , green arrows – from  $i:S29^{PF}$ . Right: *Pp1-diagnostic* marker – purple arrows indicate PCR products corresponding to dominant alleles of the *Pp-D1* gene; marker *Xgwm0111* for introgression diagnosis – green arrows indicate DNA fragments inherited from the purple-grained isogenic line  $i:S29^{PF}$ . See the line numbering in Table 2

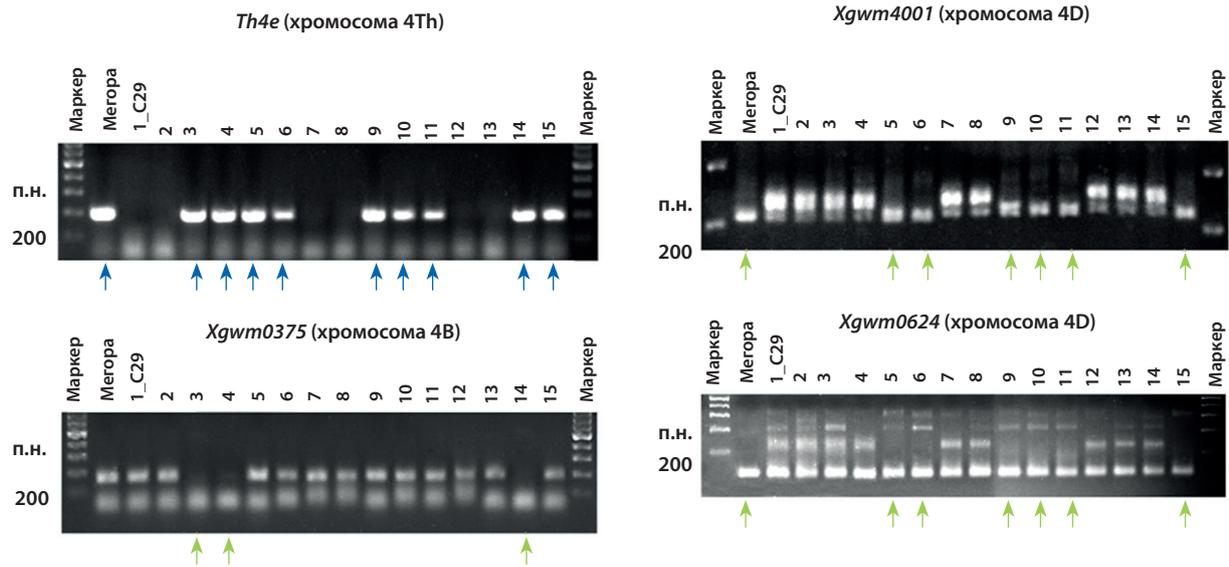
основе BW49880, короткие интрогрессированные участки на хромосоме 2A от сорта Purple, унаследованные от линии  $\phi C29^P$  (оранжевые стрелки на рис. 2 слева). ПЦР-продукты, полученные с помощью маркера *Xgwm0294* на ДНК сорта Элемент 22 и созданных на его основе линий 12–15, не отличались от ПЦР-продукта, полученного на ДНК линии  $\phi C29^{PF}$ , несущей участок интрогрессии в хромосоме 2A, от сорта Purple Feed (зеленые стрелки на рис. 2 слева).

Разработанный внутригенный маркер *Pp1-diagnostic* позволял выявлять одновременно как доминантные, так и рецессивные аллели генов *Pp-1*, картированных в коротком плече каждой из хромосом 7A, 7B и 7D. Продукты ПЦР длиной 478 п.н., полученные с помощью амплификации ДНК голубозерных линий 3, 5, 9, 14 и родительских сортов-реципиентов Саратовская 29, Элемент 22 и линии BW49880, соответствовали рецессивным аллелям генов *Pp-A1* и *Pp-B1*, тогда как продукты ПЦР, амплифицируемые на ДНК фиолетово-, чернозерных линий 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, и  $\phi C29^{PF}$ , имеющих антоциановую окраску coleoptилей, содержали помимо фрагментов длиной 478 п.н. более короткие фрагменты ДНК длиной 434 п.н., соответствующие доминантному аллелю гена *Pp-D1* (фиолетовые стрелки на рис. 2 справа). С помощью микросателлитных маркеров *Xgwm0044* и *Xgwm0111*, сцепленных с геном *Pp-D1*, диагностирован интрогрессированный фрагмент на хромосоме 7D. Более короткие продукты ПЦР маркера *Xgwm0111* показали наследование интрогрессии от сорта Purple Feed у линий 2, 4, 6,

13, 15,  $\phi C29^{PF}$  (зеленые стрелки на рис. 2 справа). Интрогрессированный участок на хромосоме 7D от сорта Purple Feed короче, чем от Purple (см. Приложение), и диагностические SSR-маркеры *Xgwm0437* и *Xgwm1002* в линиях, наследующих интрогрессию от сорта Purple Feed, амплифицировали ПЦР-фрагменты, не отличающиеся от Саратовской 29.

После гибридизации и отбора растений в поколении 2 гибридов у голубо- и чернозерных линий 3, 4, 14 наблюдалось появление продуктов ПЦР маркера *ThMyc4E-specific* одновременно с отсутствием продуктов амплификации микросателлитного маркера *Xgwm0375*, локализованного на хромосомах пшеницы 4B (рис. 3, слева), тогда как у линий 5, 6, 9, 10, 11, 15 и сорта Мерора наличие ПЦР-продукта маркера *ThMyc4E-specific* сопровождалось отсутствием продуктов амплификации маркеров *Xgwm0624* и *Xgwm4001*, локализованных на хромосоме пшеницы 4D (см. рис. 3, справа), что свидетельствует о замещении пары пшеничных хромосом 4B или 4D парой ортологичных хромосом пырея 4Th.

Голубозерные линии на основе сорта Саратовская 29 с замещением хромосом 4B и 4D хромосомами пырея 4Th имели более щуплые зерновки и практически не отличались друг от друга. В голубозерной линии на основе сорта Элемент 22 произошло замещение хромосомы 4B, несмотря на то что донорная линия несла пару хромосом пырея 4Th вместо пары хромосом 4D. Зерна всех трех наборов отличающихся по цвету зерновок линий пшеницы представлены на рис. 4. Голубозерная (№ 9) и одна из чернозерных

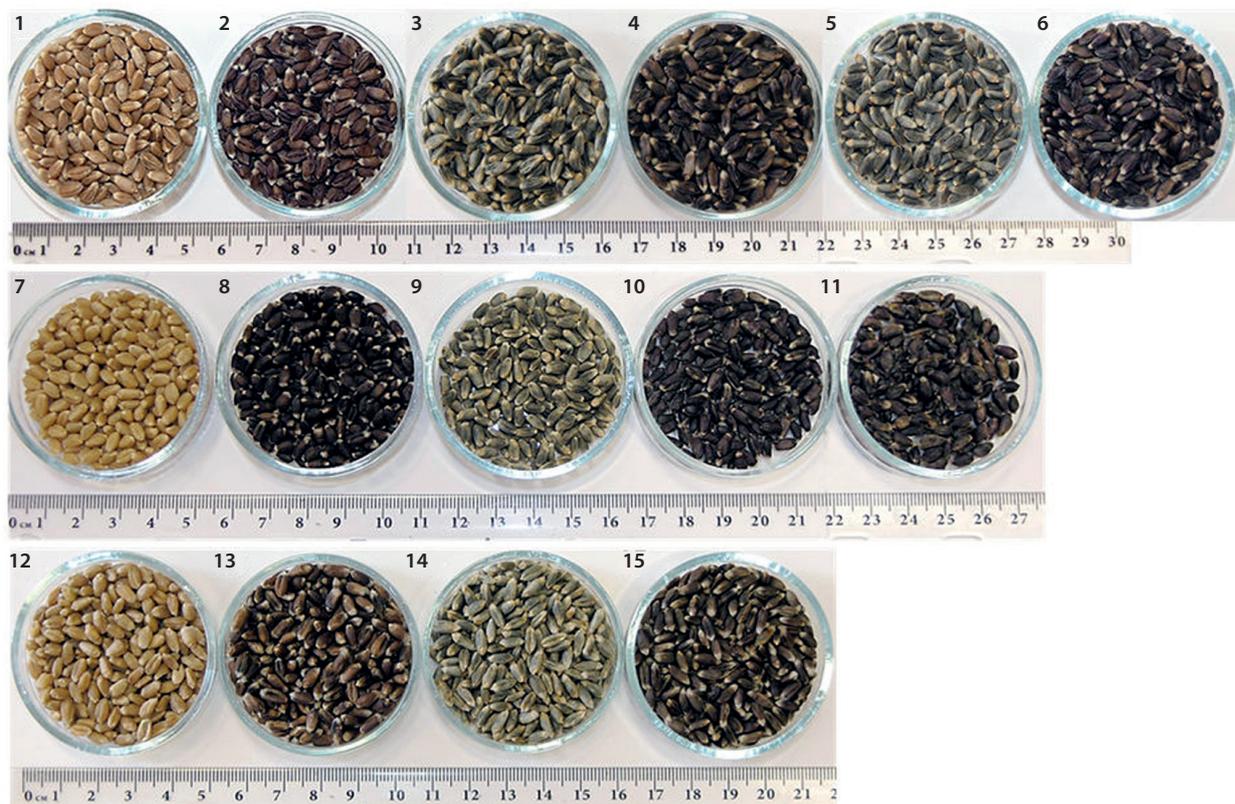


**Рис. 3.** Электрофореграммы продуктов ПЦР для определения генов голубой окраски зерновок мягкой пшеницы

Слева: маркер *ThMyc4E-specific* – синими стрелками отмечены продукты ПЦР, соответствующие хромосоме пырея 4Th; маркер *Xgwm0375* – зелеными стрелками отмечено отсутствие пары пшеничных хромосом 4B. Справа: маркеры *Xgwm4001* и *Xgwm0624* – зелеными стрелками отмечено отсутствие пары пшеничных хромосом 4D. Нумерация линий указана в табл. 2

**Fig. 3.** Electrophoregrams of the PCR products for determining the blue color genes in the wheat grains

Left: *ThMyc4E-specific* marker – blue arrows indicate PCR products corresponding to wheatgrass chromosome 4Th; SSR marker *Xgwm0375* – green arrows indicate the absence of wheat chromosome pair 4B. Right: SSR markers *Xgwm4001* and *Xgwm0624* – green arrows indicate the absence of wheat chromosome pair 4D. See Table 2 for line numbering



**Рис. 4.** Зерновки линий мягкой пшеницы с различной антоциановой окраской на основе сорта Саратовская 29 (BC<sub>7-9</sub> гибридов, линии 1–6), селекционной линии BW49880 (BC<sub>1</sub>, линии 7–11) и сорта Элемент 22 (BC<sub>1</sub>, линии 12–15), созданные методом гибридизации и отбора с помощью молекулярных маркеров

**Fig. 4.** Grains of the anthocyanin biosynthesis wheat lines based on cv. Saratovskaya 29 (BC<sub>7-9</sub>, lines 1–6), line BW49880 (BC<sub>1</sub>, 7–11), and cv. Element 22 (BC<sub>1</sub>, 12–15) backgrounds, created by the method of classical hybridization and selection with the help of the molecular markers

линий (№ 10) отличались от родительской линии BW49880 отсутствием остистости колоса, связанным с переносом доминантного гена-ингибитора остистости *B1* от сорта Саратовская 29. Среди фиолетовозерных особенно темными были зерновки линии № 8, полученной на основе BW49880. Чернозерные остистая и безостая линии BW49880 также имели более насыщенный темный пигмент в отличие от чернозерных линий на основе сортов Саратовская 29 и Элемент 22.

#### Суммарное содержание антоцианов

Суммарное содержание антоцианов в метанольных экстрактах из цельнозерновой (с отрубями) муки определяли у растений, выращенных в осенний период 2021 г. в гидропонной теплице ИЦиГ СО РАН. Антоцианы в зерновках родительских сортообразцов Саратовская 29, BW49880, Элемент 22 значимо не отличались друг от друга (группа **a** по уровню значимости, *U*-test), хотя белозерная селекционная линия BW49880 имела наиболее низкое значение – 4.7 мкг/г (рис. 5).

Среди фиолетовозерных образцов линия № 8 на основе BW49880 имела самое высокое значение суммарного содержания антоцианов (639.9 мкг/г), значимо не отличающееся от чернозерных линий на основе данной селекционной линии (602.0 и 688.8 мкг/г) и превышающее суммарное содержание антоцианов чернозерных линий на основе двух других сортов – Саратовская 29 (517.9 и 521.4 мкг/г) и Элемент 22 (429.4 мкг/г). Это, вероятно, связано с присутствием в зерновках селекционной линии BW49880 повышенного содержания цинка. В то же время чернозерная безостая линия № 10 с более мелкими зерновками показала более высокое САА в сравнении с остистой крупнозерной линией № 11 (688.8 против 602.0 мкг/г).

Голубозерные линии на основе сорта Саратовская 29 с замещениями разных хромосом (4В и 4D) хромосомами пырея 4Th по содержанию антоцианов в зерновках значимо не отличались – средние значения 295.0 и 279.9 мкг/г соответственно (см. рис. 5). Голубозерная линия на основе сорта Элемент 22, имея достоверно более крупные зерновки и массу 1000 зерен – 39.3 г, в то же время значимо не отличалась по суммарному содержанию антоцианов (306.0 мкг/г) от голубозерных линий сорта Саратовская 29, превышая последних по данному показателю. Самое низкое значение суммарного содержания антоцианов и массы 1000 зерен среди голубозерных линий отмечено у линии № 9, созданной на основе BW49880.

## Обсуждение

#### Молекулярное генотипирование гибридных и родительских линий

С использованием гибридизации и отбора с помощью маркеров нами получены и проанализированы три набора линий яровой мягкой пшеницы с различной окраской зерновок, созданных на основе сорта Саратовская 29 (линии 1–6), линии BW49880 (7–11) и сорта Элемент 22 (12–15) (см. табл. 2).

Фиолетовозерные линии на основе сорта Элемент 22 и линии BW49880 созданы ранее в результате скрещивания

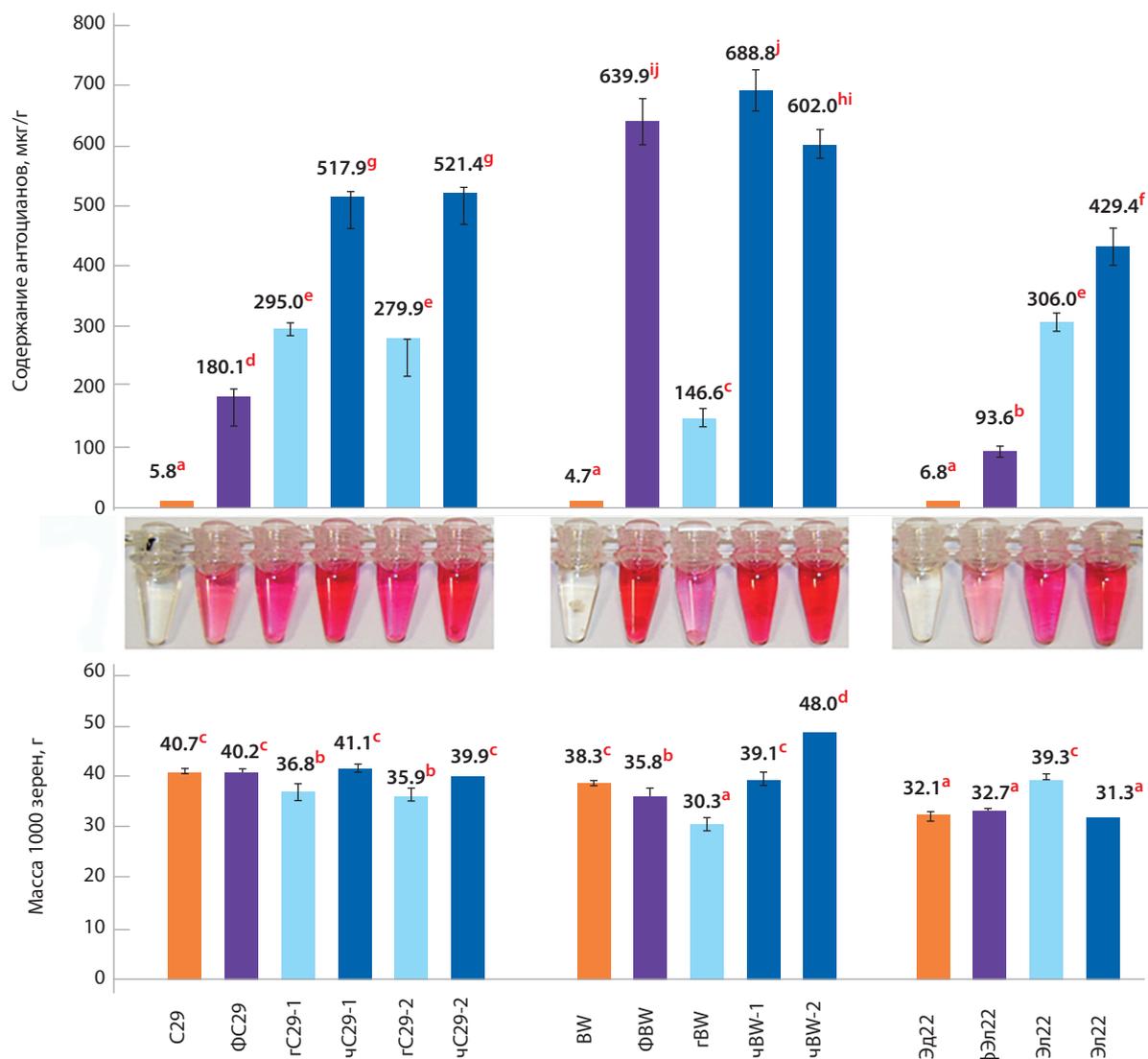
и беккроссирования с фиолетовозерными изогенными линиями  $\phi C29^P$  и  $\phi C29^{PF}$  сорта Саратовская 29, содержащими участки хромосом 2A и 7D сортов Purple и Purple Feed соответственно, с доминантными аллелями регуляторных генов биосинтеза антоцианов *Pp-D1* и *Pp3* (Gordeeva et al., 2020; Хлесткина и др., 2021) (см. рис. 1).

Голубозерные линии на основе сорта Элемент 22 и линии BW49880 получены в результате их скрещивания с донорной голубозерной линией сорта Саратовская 29 (BC<sub>7</sub>), содержащей в геноме пару хромосом 4Th пырея с доминантными генами *Va1*, перенесенными ранее от озимого сорта пшеницы из Болгарии Мегора, и, как нами установлено, заместившей пару хромосом 4D пшеницы (Gordeeva et al., 2019) и последующего беккроссирования (см. рис. 1). Однако при молекулярном анализе гибридной голубозерной линии, полученной на основе сорта Элемент 22, выявлено, что у этой линии вместо пары хромосом 4D произошла замена пары хромосом 4В хромосомами пырея 4Th. Подобный эффект смены замещения пшеничных хромосом 4В вместо 4D отмечен нами ранее при создании голубозерных линий на основе сорта Саратовская 29 (Gordeeva et al., 2022).

Однако хромосомы 4В и 4D не полностью гомологичны. Хромосома 4D имеет один из самых низких уровней полиморфизма ДНК (Gupta et al., 2008). В хромосоме 4В выявлена наиболее протяженная область горячих точек QTL для массы зерна (Guan et al., 2018) и расположены четыре кластера, содержащие 45 QTL для регуляции минерального питания К, Са и Mg (Shen et al., 2019). В связи с чем к данной хромосоме пшеницы привлечено повышенное внимание исследователей как к потенциальной мишени для пирамидирования «полезных» генов в одном геноме. Следовательно, при селекции необходимо контролировать, какая именно пара гомологичных хромосом пшеницы, 4В или 4D, замещена хромосомами пырея.

Для увеличения содержания антоцианов и пирамидирования антоцианов в алейроне и перикарпе в зерновках пшеницы целесообразно получение чернозерных образцов (Syed Jaafar, 2013; Garg, 2016). Для этого нами произведено скрещивание голубозерных с фиолетовозерными растениями внутри трех наборов линий. Неоценимую роль в отборе растений в F<sub>2</sub> гибридов сыграло использование молекулярных маркеров, поскольку требовалось одновременно отобрать три пары доминантных аллелей регуляторных генов биосинтеза антоцианов *Pp-D1*, *Pp3* и *Va1*, а также диагностировать замещения хромосом 4-й гомеологичной группы мягкой пшеницы и наследования интрогрессированных рекомбинантных участков хромосом 2A и 7D (см. Приложение). Для этих целей использовали внутригенные маркеры *Pp1-diagnostic*, *Pp3-diagnostic*, *ThMyc4E-specific* и сцепленные с ними микросателлитные маркеры (см. табл. 1).

Маркер *Pp3-diagnostic* позволил четко выявлять доминантные и рецессивные аллели гена *Pp3* и отобрать доминантные аллели этого гена в гомозиготном состоянии. С использованием микросателлитных маркеров Xgwm0294 и Xgwm0312 можно определить наследование интрогрессии с искомым аллелем гена *Pp3*. Внутригенный маркер *Pp1-diagnostic* позволял одновременно выявить как доминантный аллель гена *Pp-D1*, так и рецессивные аллели



**Рис. 5.** Суммарное содержание антоцианов в метанольных экстрактах из цельнозерновой муки и масса 1000 зерен в наборах линий мягкой пшеницы с различной антоциановой окраской на основе сортообразцов Саратовская 29 (линии 1–6), BW49880 (7–11) и Элемент 22 (12–15) Буквами (a, b, c, d...) отмечены статистически значимые различия между группами

**Fig. 5.** The total anthocyanin contents in methanol extracts from whole-wheat flour and weight of one thousand grains in sets of grain colored wheat lines based on parental varieties Саратовская 29 (lines 1–6), BW49880 (7–11), and Element 22 (12–15)

Letters (a, b, c, d...) indicate statistically significant differences between the groups

гомеологичных генов *Pp-A1* и *Pp-B1* (см. рис. 2). Данные гены регулируют синтез антоцианов одновременно в перикарпе и колеоптиле. Поэтому для определения наличия доминантного аллеля гена *Pp-D1* альтернативно молекулярному генотипированию и/или совместно с ним нами проведена фенологическая оценка пигментации колеоптилей у 4–5-дневных проростков перед их высадкой. С помощью микросателлитных маркеров *Xgwm0044* и *Xgwm0111*, *Xgwm0437* и *Xgwm1002*, локализованных на хромосоме 7D, можно оценить размер рекомбинантного фрагмента, несущего доминантный аллель гена *Pp-D1*.

Голубозерные растения пшеницы в  $F_2$  гибридов можно отобрать по фенотипу. Однако оценка наличия голубого пигмента в алейроне затруднена при отборе черnozерных растений, которые накапливают одновременно антоциа-

ны и в перикарпе, и в алейроне. Маркер *ThMyc4E-specific* совместно с микросателлитными маркерами к хромосомам 4B (*Xgwm0251*, *Xgwm0375*) и 4D (*Xgwm0609*, *Xgwm0624*, *Xgwm4001*) позволил в  $F_2$  гибридов диагностировать и отобрать голубо- и черnozерные формы с парой пырейных хромосом 4Th, замесивших после гибридизации пару хромосом 4B, либо 4D (Гордеева и др., 2022; Gordeeva et al., 2022). Наблюдаемое отсутствие продуктов амплификации микросателлитных маркеров, локализованных на хромосомах 4B или 4D (см. рис. 3), свидетельствует о потере данных хромосом у голубо- и черnozерных линий пшеницы и их замещении пырейной парой 4Th, что подтверждает появление в геноме этих линий продуктов ПЦР маркера *ThMyc4E-specific*. Наличие у гибридных образцов одновременно ПЦР-продуктов маркеров, локализованных на хромосомах

4В и 4D, указывает на неполное замещение хромосом пшеницы хромосомами 4Th пырея.

Разработанные нами внутригенные маркеры к регуляторным генам биосинтеза антоцианов совместно со сцепленными с данными генами микросателлитными маркерами могут быть использованы в селекции линий мягкой пшеницы, накапливающих антоцианы одновременно в перикарпе и алейроновом слое зерновки, на основе любых коммерческих сортов.

#### Оценка суммарного содержания антоцианов в зерновках

Несмотря на одинаковое происхождение доминантных генов *Pp-D1*, *Pp3*, *Va1* от донорных родителей, линии пшеницы с различной окраской зерновок, полученные на основе разных сортов, отличались друг от друга по суммарному содержанию антоцианов, что доказывает влияние генотипа реципиента на выраженность этого показателя. У линий, созданных на основе сортов Саратовская 29 и Элемент 22, отмечено увеличение количества антоцианов по возрастающей шкале: краснозерные < фиолетовозерные < голубозерные < чернозерные. В наборе линий, созданных на основе белозерной селекционной линии BW49880, количество антоцианов голубозерной линии было значительно ниже (146.6 мкг/г) данного показателя фиолетовозерной линии (639.9 мкг/г) (см. рис. 5). Фиолетовозерный образец значимо не отличался от чернозерных линий на основе данной селекционной линии (602.0 и 688.8 мкг/г), что можно объяснить наличием у нее повышенного содержания Zn и эффектом хелатирования металлов антоцианами в наружных слоях зерновки. Так, ранее в Индии (Мохали, Пенджаб) с помощью гибридизации адаптированных к местным условиям индийских сортов пшеницы PBW550, PBW621 и HD2967 с низкоурожайными линиями – голубозерной TA3972 с замещением 4BL на пырейную 4EL (синоним 4ThL) и фиолетовозерной TA3851 (Канзас, США), а также с чернозерной пшеницей с заменой 4E(4D) (синоним 4Th(4D)) (Тоттори, Япония) вывели коммерческие высокоурожайные, устойчивые к болезням линии озимой пшеницы с различной антоциановой окраской зерновок (Sharma et al., 2018). В полученных данными авторами линиях содержание антоцианов в зерновках возрастало по шкале: белозерные (13.0 ± 0.2 мкг/г) < голубозерные (120.6 ± 2.1 мкг/г) < фиолетовозерные (122.5 ± 9.8 мкг/г) < чернозерные (134.0 ± 8.4 мкг/г). Содержание Fe и Zn в зерновках новых линий пшеницы было выше, чем в родительских белозерных образцах.

Несмотря на то что при благоприятных условиях выращивания общее количество антоцианов в зерновках фиолетовозерной линии BW49880 приближается к суммарному содержанию антоцианов в зерновках чернозерных образцов, линии с различной окраской зерновок отличаются по составу данных соединений. Наиболее распространенными антоцианами в фиолетовом перикарпе зерновок являются цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-рутинозид и пеонидин-3-глюкозид, в голубом алейроновом слое доминирует дельфинидин-3-глюкозид, пеларгонидин-3-глюкозид, за которыми следует цианидин-3-рутинозид, дельфинидин-3-рутинозид и др. (Abdel-Aal et al., 2016; Sharma et al., 2018). Чернозерные растения, накапливающие антоцианы и в пе-

рикарпе, и в алейроновом слое, таким образом, обладают не только самым высоким общим количеством антоцианов в зерновках, но и более разнообразным их содержанием.

Средняя масса 1000 зерен линий индийской пшеницы с различной антоциановой окраской зерновок существенно не отличалась от высокоурожайных сортов-контролей (Sharma et al., 2018). В нашей работе средняя масса 1000 зерен была достоверно ниже у голубозерных образцов на основе сорта Саратовская 29 и линии BW49880. В то же время голубозерная линия на основе сорта Элемент 22 достоверно превышала сорт-реципиент (39.3 г) (см. рис. 5) и другие голубозерные линии по данному показателю. Средняя масса 1000 зерен чернозерных линий была на уровне родительских сортов и даже превышала их в чернозерных образцах линии BW49880 (39.1 и 48.8 в сравнении с 38.3 г) (см. рис. 5), что свидетельствует о влиянии родительского генотипа на качество и количество зерновок в новых гибридных линиях. В настоящее время лучшие линии включены в селекционный процесс Омского ГАУ.

#### Заключение

Маркеры *Pp1-diagnostic*, *Pp3-diagnostic*, *ThMyc4E-specific*, разработанные нами к регуляторным генам биосинтеза антоцианов, совместно со сцепленными с генами микросателлитными маркерами показали высокую эффективность при создании линий мягкой пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в зерновках. В качестве перспективного донора генов биосинтеза антоцианов и для обогащения цинком коммерческих сортов мы предлагаем использовать чернозерные линии, полученные на основе селекционной линии BW49880. Эти линии помимо генов окраски обладают комплексной устойчивостью к стеблевой и листовой ржавчинам. В селекции в качестве донора доминантного гена *Va1* предлагаем применять голубозерную линию, полученную на основе сорта Элемент 22, показавшую помимо высокого уровня антоцианов в алейроне достоверно значимое повышение массы 1000 зерен.

#### Список литературы / References

- Арбузова В.С., Бадаева Е.Д., Ефремова Т.Т., Осадчая Т.С., Трубачева Н.В., Добровольская О.Б. Цитогенетическое изучение голубозерной линии мягкой пшеницы сорта Саратовская 29. *Генетика*. 2012;48(8):926-933.  
[Arbuzova V.S., Badaeva E.D., Efremova T.T., Osadchaya T.S., Trubacheva N.V., Dobrovolskaya O.B. A cytogenetic study of the blue-grain line of the common wheat cultivar Saratovskaya 29. *Russian Journal of Genetics*. 2012;48(8):785-791. DOI 10.1134/S102279541205002X]
- Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Способ отбора гибридов мягкой пшеницы с голубой окраской зерновки. Патент № 2790186, 01.06.2022.  
[Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Khlestkina E.K. Method for the selection of the bread wheat hybrids with blue grain color. Patent No. 2790186, 01.06.2022. (in Russian)]
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993.  
[Zaprometov M.N. Phenolic compounds. Distribution, metabolism and functions in plants. Moscow: Nauka Publ., 1993. (in Russian)]
- Коваль С.Ф. Каталог изогенных линий сорта мягкой пшеницы Новосибирская 67 и принципы их использования в эксперименте. *Генетика*. 1997;33(8):1168-1173.  
[Koval' S.F. The catalog of near-isogenic lines of Novosibirskaya-67 common wheat and principles of their use in experiments. *Genetica (Moscow)*. 1997;33(8):995-1000]

- Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Структурно-функциональная организация и эволюция генов семейства *WD40*, участвующих в регуляции биосинтеза флавоноидов у представителей трибы *Triticeae*. *Генетика*. 2019;55(11):1350-1358. DOI 10.1134/S0016675819110158.
- [Strygina K.V., Khlestkina E.K. Structural and functional organization and evolution of the *WD40* genes involved in the regulation of flavonoid biosynthesis in the *Triticeae* tribe. *Russian Journal of Genetics*. 2019;55(11):1398-1405. DOI 10.1134/S1022795419110152]
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):202-216.
- [Khlestkina E.K. Genes determining coloration of different organs in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):202-216. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Кукоева Т.В., Шаманин В.П., Моргунов А.И. Способ отбора линий яровой мягкой пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в зерне. Патент № 2762804 С1, 09.02.2021.
- [Khlestkina E.K., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Kukoeva T.V., Shamanin V.P., Morgunov A.I. A method of selection of the spring bread wheat lines with a high content of anthocyanins in the grain. Patent No. 2762804 C1, 09.02.2021. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И. Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):784-796.
- [Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/1):784-796. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С., Пожерукова В.Е., Салина Е.А., Сколотнева Е.С., Ходсон Д., Хоумвёллер М., Патпур М., Моргунов А.И. Стеблевая ржавчина Западной Сибири – расовый состав и эффективные гены устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(2):131-138. DOI 10.18699/VJ20.608.
- [Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Pozherukova V.E., Salina E.A., Skolotneva E.S., Hodson D., Novmoller M., Patpour M., Morgunov A.I. Stem rust in Western Siberia – race composition and effective resistance genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):131-138. DOI 10.18699/VJ20.608. (in Russian)]
- Шоева О.Ю., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Внутригенный ДНК-маркёр для отбора пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в перикарпе зерновки. Патент № 2774444, 29.11.2021.
- [Shoeva O.Yu., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. An intragenic DNA marker for the selection of the wheat with an increased content of anthocyanins in the grain pericarp. Patent No. 2774444, 29.11.2021. (in Russian)]
- Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022.
- [Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022. (in Russian)]
- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*. 1999;76(3):350-354. DOI 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350.
- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P., Shipp J., Rabalski I. Compositional Differences in Anthocyanins from Blue-and Purple-Grained Spring Wheat Grown in Four Environments in Central Saskatchewan. *Cereal Chem*. 2016;93(1):32-38. DOI 10.1094/CCHEM-03-15-0058-R.
- Arbuzova V.S., Maystrenko O.I. Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Res. Comm*. 2000;28(3):235-237. DOI 10.1007/BF03543599.
- Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar 'Saratovskaya 29'. *Cereal Res. Com*. 1998;26(1):39-46. DOI 10.1007/BF03543466.
- Dubcovsky J., Luo M.C., Zhong G.Y., Bransteitter R., Desai A., Kilian A., Kleinhofs A., Dvořák J. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*. 1996;143(2):983-999. DOI 10.1093/genetics/143.2.983.
- Dwivedi S.L., Mattoo A.K., Garg M., Dutt S., Singh B., Ortiz R. Developing germplasm and promoting consumption of anthocyanin-rich grains for health benefits. *Front. Sust. Food Syst*. 2022;6:867897. DOI 10.3389/fsufs.2022.867897.
- Garg M., Chawla M., Chunduri V., Kumar R., Sharma S., Sharma N.K., Kaur N., Kumar A., Munday J.K., Saini M.K., Singh S.P. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *J. Cereal Sci*. 2016;71:138-144. DOI 10.1016/j.jcs.2016.08.004.
- Gordeeva E., Badaeva E., Yudina R., Shchukina L., Shoeva O., Khlestkina E. Marker-assisted development of a blue-grained substitution line carrying the *Thinopyrum ponticum* chromosome 4Th(4D) in the spring bread wheat Saratovskaya 29 background. *Agronomy*. 2019;9(11):723. DOI 10.3390/agronomy9110723.
- Gordeeva E., Shamanin V., Shoeva O., Kukoeva T., Morgounov A., Khlestkina E. The strategy for marker-assisted breeding of anthocyanin-rich spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in Western Siberia. *Agronomy*. 2020;10(10):1603. DOI 10.3390/agronomy10101603.
- Gordeeva E., Shoeva O., Mursalimov S., Adonina I., Khlestkina E. 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;12(12):2934. DOI 10.3390/agronomy12122934.
- Guan P., Lu L., Jia L., Kabir M.R., Zhang J., Lan T., Zhao Y., Xin M., Hu Z., Yao Y., Ni Z., Sun Q., Peng H. Global QTL analysis identifies genomic regions on chromosomes 4A and 4B harboring stable loci for yield-related traits across different environments in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci*. 2018;9:529. DOI 10.3389/fpls.2018.00529.
- Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A., Kumar J. Wheat genomics: present status and future prospects. *Int. J. Plant Genomics*. 2008;2008:896451. DOI 10.1155/2008/896451.
- Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues. *Mol. Genet. Genomics*. 2015;290(4):1287-1298. DOI 10.1007/s00438-015-0991-0.
- Jiang W., Liu T., Nan W., Jeewani D.C., Niu Y., Li C., Wang Y., Shi X., Wang C., Wang J., Li Y., Gao X., Wang Z. Two transcription factors TaPpm1 and TaPpb1 co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat. *J. Exp. Bot*. 2018;69(10):2555-2567. DOI 10.1093/jxb/ery101.
- Keppenne V.D., Baenziger S. Inheritance of the blue aleurone trait in diverse wheat crosses. *Genome*. 1990;33(4):525-529. DOI 10.1139/g90-078.
- Korzun V., Röder M., Worland A.J., Börner A. Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. 1997;116(3):227-232. DOI 10.1111/j.1439-0523.1997.tb00987.x.
- Landi M., Tattini M., Gould K.S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Env. Exp. Botany*. 2015;119:4-17. DOI 10.1016/j.envexpbot.2015.05.012.
- Lap B., Rai M., Tyagi W. Playing with colours: genetics and regulatory mechanisms for anthocyanin pathway in cereals. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*. 2021;37(1):1-29. DOI 10.1080/02648725.2021.1928991.
- Li N., Li S., Zhang K., Chen W., Zhang B., Wang D., Liu D., Liu B., Zhang H. *THMYC4E*, candidate *Blue aleurone 1* gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum*. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181116. DOI 10.1371/journal.pone.0181116.
- Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theor. Appl. Genet*. 1999;98:226-233. DOI 10.1007/s001220051062.
- 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 myc-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86(18):7092-7096. DOI 10.1073/pnas.86.18.7092.
- Plaschke J., Ganai M.W., Roeder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet*. 1995;91(6-7):1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganai M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149(4):2007-2023. DOI 10.1093/genetics/149.4.2007.
- Sharma S., Chunduri V., Kumar A., Kumar R., Khare P., Kondepudi K.K., Bishnoi M., Garg M. Anthocyanin bio-fortified colored wheat: Nutritional and functional characterization. *PLoS One*. 2018;13(4):e0194367. DOI 10.1371/journal.pone.0194367.

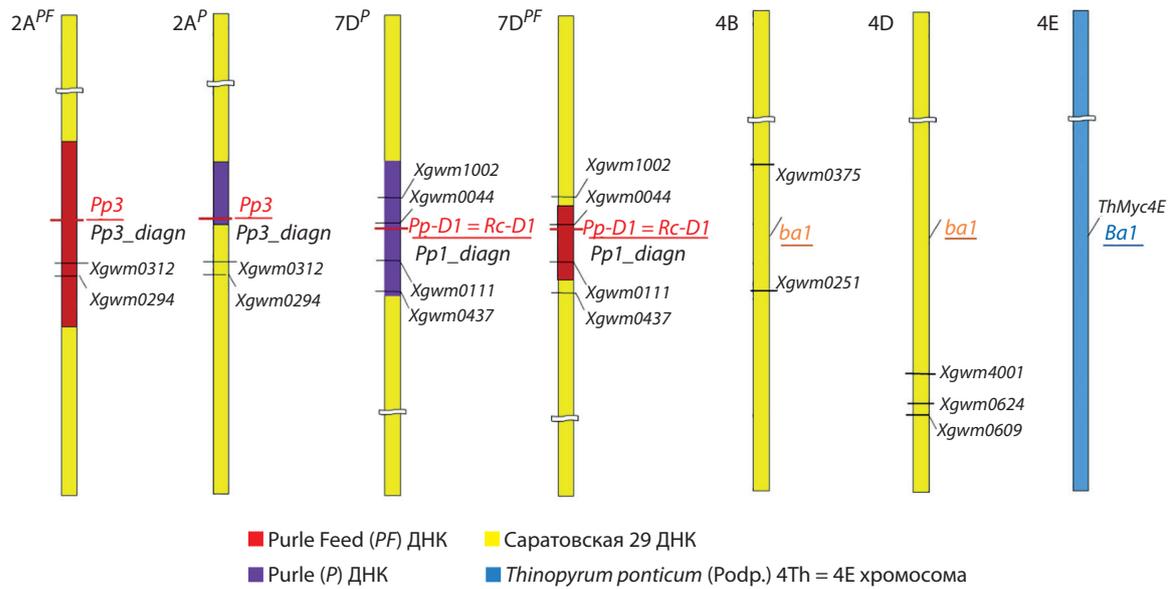
- Shen X., Yuan Y., Zhang H., Guo Y., Zhao Y., Li S., Kong F. The hot QTL locations for potassium, calcium, and magnesium nutrition and agronomic traits at seedling and maturity stages of wheat under different potassium treatments. *Genes*. 2019;10(8):607. DOI 10.3390/genes10080607.
- Shen Y., Shen J., Dawadondup, Zhuang L., Wang Y., Pu J., Feng Y., Chu C., Wang X., Qi Z. Physical localization of a novel blue-grained gene derived from *Thinopyrum bessarabicum*. *Mol. Breed.* 2013;31:195-204. DOI 10.1007/s11032-012-9783-y.
- 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.
- Singh K., Ghai M., Garg M., Chhuneja P., Kaur P., Schnurbusch T., Keller B., Dhaliwal H.S. An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(3):301-312. DOI 10.1007/s00122-007-0543-z.
- Syed Jaafar S.N., Baron J., Siebenhandl-Ehn S., Rosenau T., Böhmendorfer S., Grausgruber H. Increased anthocyanin content in purple pericarp × blue aleurone wheat crosses. *Plant Breed.* 2013;132(6):546-552. DOI 10.1111/pbr.12090.
- Wang C., Shu Q. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin. Sci. Bull.* 2007;52:3097-3104. DOI 10.1007/s11434-007-0472-x.
- Wang X., Zhang X., Hou H., Ma X., Sun S., Wang H., Kong L. Metabolomics and gene expression analysis reveal the accumulation patterns of phenylpropanoids and flavonoids in different colored-grain wheats (*Triticum aestivum* L.). *Food Res. Int.* 2020;138(Pt. A):109711. DOI 10.1016/j.foodres.2020.109711.
- Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*. 1991;56:243-258. DOI 10.1007/BF00042371.
- Zheng Q., Li B., Mu S., Zhou H., Li Z. Physical mapping of the blue-grained gene(s) from *Thinopyrum ponticum* by GISH and FISH in a set of translocation lines with different seed colors in wheat. *Genome*. 2006;49(9):1109-1114. DOI 10.1139/g06-073.
- Zong Y., Xi X., Li S., Chen W., Zhang B., Liu D., Liu B., Wang D., Zhang H. Allelic variation and transcriptional isoforms of wheat *TaMYC1* gene regulating anthocyanin synthesis in pericarp. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1645. DOI 10.3389/fpls.2017.01645.

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования, при сборе, анализе или интерпретации данных, в написании рукописи или решении опубликовать результаты.

Поступила в редакцию 4.04.2023. После доработки 10.04.2023. Принята к публикации 11.04.2023.

Приложение



Схематическое изображение хромосом, на которых картированы регуляторные гены биосинтеза антоцианов *Pp3*, *Pp-D1*, *Ba1* и сцепленные с ними молекулярные маркеры, использованные в работе. Различным цветом показаны участки интрогрессий, унаследованные от донорных линий

Schematic representation of the chromosomes with the mapped anthocyanin biosynthesis regulatory genes *Pp3*, *Pp-D1*, *Ba1* and linked with them molecular markers used in this study. Different color shows fragments introgressed in Saratovskaya 29 genome from donor lines