

ОТЕЧЕСТВЕННАЯ СЕЛЕКЦИЯ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Научная статья
УДК 633.112.6:575.827.5
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148



Маркер-ориентированная селекция в создании гибридных линий *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. с фиолетовоокрашенным зерном

П. И. Стёпочкин¹, Е. И. Гордеева², Е. К. Хлесткина^{2,3}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции, Новосибирская обл., Россия

² Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Петр Иванович Стёпочкин, petstep@ngs.ru

Актуальность. Злаки, содержащие полезные для здоровья людей антиоксиданты, представляют интерес для использования их в функциональном питании. Антоцианы, придающие зерну фиолетовую окраску, являются антиоксидантами, и работы по увеличению их содержания актуальны. Целью данной работы была оценка по содержанию антоцианов в зерне и по продуктивности селекционных линий гибридов полбы с фиолетовой окраской зерна.

Материалы и методы. Изучали линии F₂, созданные двухступенчатой гибридизацией фиолетовозерной эфиопской пшеницы (*Triticum aethiopicum* Jakubz. var. *arraseita*) с полбой (*Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl.), и выделенные в F₂ с помощью маркер-ориентированной селекции по гомозиготным доминантным аллелям двух генов, комплементарное взаимодействие которых приводит к фиолетовой окраске зерна. В происхождении линий участвовали сорт голозерной полбы 'Греммэ', безостая полба к-25516 из мировой коллекции ВИР и эфиопская пшеница TRI15744 – донор фиолетовой окраски перикарпия зерна из коллекции IPK Gatersleben. Определяли содержание антоцианов в муке из цельного зерна у 12 линий и родительских форм, проводили структурный анализ растений и оценивали количественные признаки.

Результаты. Наивысшее содержание антоцианов (82,5 мкг на 1 г) отмечено у линии № 10 гибрида 27-3. Наибольшее количество зерновок без пленок (86,9 ± 7,3%) вымолочено у линии № 6 гибрида 31-19. Высокая натура зерна (802 ± 13 г/л) отмечена у линии № 11 гибрида 27-12. По зерновой продуктивности отличилась линия № 9 гибрида 27-1 (389 ± 25 г/м²).

Заключение. Маркер-ориентированный метод селекции позволил выделить гомозиготные доминантные аллели двух комплементарно взаимодействующих генов *Pp3* и *Pp-B1*, отвечающих за проявление фиолетовой окраски перикарпия зерна. Линии с фиолетовым перикарпием характеризуются различным содержанием в нем антоцианов, различной натурой зерна и продуктивностью. Селекционную ценность представляют линии с высокими показателями этих признаков.

Ключевые слова: полба, гибрид, селекционная линия, признак, антоцианы

Благодарности: работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0018.

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

Для цитирования: Стёпочкин П.И., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Маркер-ориентированная селекция в создании гибридных линий *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. с фиолетовоокрашенным зерном. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):139-148. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148

DOMESTIC PLANT BREEDING AT THE PRESENT STAGE

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148

Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grainPetr I. Steepochkin¹, Elena I. Gordeeva², Elena K. Khlestkina^{2,3}¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding, Novosibirsk Province, Russia² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia³ N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia**Corresponding author:** Petr I. Steepochkin, petstep@ngs.ru

Background. Cereals whose grain contains antioxidants salutary for human health are promising for functional nutrition. Anthocyanins inducing purple grain color are antioxidants, and it is crucial to make efforts towards increasing their content in grain. The objective of this work was to assess the content of anthocyanins in emmer grain and the productivity of breeding lines with purple grain.

Materials and methods. The study included the F₉ lines developed by two-step hybridization between purple-colored Ethiopian wheat (*Triticum aethiopicum* Jakubz. var. *arraseita*) and emmer (*Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl.), and those isolated in F₂ using marker-based selection for homozygous dominant alleles of two genes. The parent forms of the hybrids were a naked-grain emmer cultivar 'Gremme', an awnless emmer accession (k-25516) from the VIR collection, and an accession from the collection of IPK Gatersleben (Ethiopian wheat line TRI 15744), the donor of the purple color. The content of anthocyanins in whole-grain flour was measured in 12 lines, a structural analysis of plants was carried out, and their quantitative characteristics were assessed.

Results. The highest anthocyanin content (82.5 µg per 1 g) was observed in line No. 10 of the 27-3 hybrid. The largest share of threshed naked grains (86.9 ± 7.3%) was recorded for line No. 6 of the 31-19 hybrid. Line No. 11 of the 27-12 hybrid had the highest test weight (802 ± 13 g/L). Line No. 9 of the 27-1 hybrid showed the best index of grain productivity (389 ± 25 g/m²).

Conclusion. Marker-assisted selection made it possible to identify homozygous dominant alleles of the two complementary interacting genes, *Pp3* and *Pp-B1*, which cause the purple color of the grain pericarp. Breeding lines with purple-colored grain demonstrated different levels of the total anthocyanin content, test weight, and grain yield. The lines with high indices of these traits are valuable for breeding practice.

Keywords: emmer, hybrid, breeding line, trait, anthocyanins

Acknowledgements: this work was supported by the budget project of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, No. FWNR-2022-0018.

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

For citation: Steepochkin P.I., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grain. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):139-148. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148

Введение

Селекционеры разных стран большое внимание уделяют созданию сортов для использования в функциональном питании цельного зерна. Одной из злаковых культур, подходящих для этого направления в селекции, является полба (*Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl.) – пшеница-двузернянка. Зерно полбы чаще используется для производства крупы. Оно богато полезными для здоровья людей высокоактивными антиоксидантами, белком, каротиноидами и полифенольными соединениями (Lachman et al., 2012). В связи с тем, что колосовой стержень двузернянки довольно ломкий и зерновка вымачивается с трудом, селекционеры предпринимают попытки создания форм полбы с зерновкой, легко отделяемой от цветковой и колосковой чешуй. Такие формы двузернянки предложено относить к подвиду *T. dicoccon* subsp. *nudicoccon* Kobył. et Smekal. (Smekalova, Kobylyansky, 2019). В данном направлении в 2012 г. в России создан Э. Ф. Ионовым голозерный сорт полбы ‘Греммэ’ (Temirbekova et al., 2014).

Селекционеры стремятся создавать сорта с высокой питательной ценностью и приспособленностью к локальным условиям среды (Lar et al., 2021). Вторичные метаболиты, определяющие у злаков окраску зерна, имеют большое значение в повышении питательной ценности. Стратегически важным для получения функциональных продуктов питания является использование ингредиентов из цельного зерна злаков (Francavilla, Joye, 2020).

Антоцианы определяют окраску зерновки у злаков и относятся к классу флавоноидных соединений, которые являются природными антиоксидантами (Procházkova et al., 2011). Пять антоциановых соединений, локализованные в перикарпии, из которых доминирует цианидин-3-гликозид, обуславливают фиолетовую окраску зерна (Abdel-Aal, 2008; Knievel et al., 2009; Trojan, 2014).

По ячменю с темноокрашенной зерновкой к настоящему времени накоплен большой объем знаний о генетическом контроле биосинтеза пигментов (Shoeva et al., 2018). На генетическом уровне изучен метаболизм флавоноидов. Фиолетовая окраска зерна пшеницы регулируется совместно комплементарным действием двух генов (транскрипционных факторов), локализованных на разных хромосомах (Khlestkina et al., 2009, 2010; Tereshchenko et al., 2012). Трудности для отбора представляет и тот факт, что перикарпий – это часть материнского растения и при селекции гибриды первого поколения от скрещивания формы, лишенной фиолетовой окраски зерна, с отцовской формой, обладающей этой окраской, будут иметь неокрашенное зерно (Zeven, 1991). И отбор нужно проводить во втором, третьем и даже четвертом поколениях на большой выборке растений.

Зерно риса с окрашенным перикарпием обладает более высокой антиоксидантной активностью (Zelenskaaya et al., 2018). У пшеницы с темной окраской зерна антоцианы играют защитную регуляторную роль против биотических и абиотических стрессоров (Wang et al., 2018).

Роль флавоноидов для здоровья человека очень важна. Они используются в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета второго типа, артритов, болезни Альцгеймера, различных видов рака и ожирения (Wang et al., 2007; Yawadio et al., 2007; Prior et al., 2008; Svorovic et al., 2010; Pojer et al., 2013). Антоцианы уменьшают агрегацию тромбоцитов и ингиби-

руют окисление липопротеинов низкой плотности (Astadi et al., 2009; Pirro et al., 2013). Поэтому в плане применения для функционального питания злаки с окрашенным зерном, используемые для производства крупы, а также продукты из цельного зерна, представляют определенный интерес. Целью данной работы была оценка по количеству содержанию антоцианов в зерне и по продуктивности гибридных линий с фиолетовой окраской зерна.

Материал и методы

В работе использовали новые линии полбы *T. dicoccon*, полученные из популяций гибридов от сложных скрещиваний в Институте цитологии и генетики СО РАН. В происхождении линий участвовали сорт голозерной полбы ‘Греммэ’, безостая полба (к-25516, Чувашия, Россия) из мировой коллекции ВИР и эфиопская пшеница *T. aethiopicum* Jakubz. (TRI 15744) – донор фиолетовой окраски перикарпия зерна из коллекции IPK Gatersleben.

На первом этапе остистую фиолетовозерную эфиопскую пшеницу TRI 15744 скрестили с остистой голозерной полбой сорта ‘Греммэ’. Полученный гибрид F_1 был опылен дважды безостой красноколосой пленчатой краснозерной полбой (к-25516). На следующем этапе путем маркер-ориентированной селекции в поколениях F_1F_2 и $F_1BC_1F_2$ проводили отбор с помощью фенотипических маркеров антоциановой окраски и с использованием микросателлитных SSR-маркеров.

В качестве фенотипического молекулярного маркера гена *Pp-1* использовали визуальную оценку – темно-красную окраску колеоптилей (Gordeeva et al., 2015). Поколение $F_1BC_1F_2$ с темно-красными колеоптилями самоопылялось с получением семян $F_1BC_1F_3$, которые собирали отдельно от каждого из растений, и полученные семейства оценивали в полевых условиях.

Для уточнения генотипа гибридов на уровне ДНК были использованы микросателлитные полиморфные ПЦР-маркеры GWM (Röder et al., 1998), фланкирующие целевые гены *Pp3* на хромосоме 2A (маркер *Xgwm0312*) и *Pp-B1* на хромосоме 7B (маркер *Xgwm0046*) (Khlestkina et al., 2009; Tereshchenko et al., 2012). ДНК экстрагировали из молодых листьев растений в соответствии с процедурой, описанной J. Plaschke с соавторами (Plaschke et al., 1995). Придерживались условий ПЦР, описанных в работе Röder с соавторами (Röder et al., 1998). Продукты ПЦР разделяли в 5-процентном агарозном геле высокого разрешения ACTGene (ACTGene, Inc., Piscataway, NJ, USA).

Молекулярный отбор гомозиготных фиолетовозерных образцов поколений F_2 проводили с помощью полиморфного ПЦР-маркера *Xgwm0312*, выбранного ранее из группы микросателлитных маркеров, сцепленных с геном *Pp3* в хромосоме 2A тетраплоидной пшеницы, и с помощью полиморфного ПЦР-маркера *Xgwm0046*, выбранного ранее из группы микросателлитных маркеров, сцепленных с геном *Pp-B1* в хромосоме 7B тетраплоидной пшеницы. Потомство выделенных этим методом растений в дальнейших поколениях было константным по данному признаку зерна.

Растения поколения $F_1BC_1F_4$ отобрали в теплице по раннеспелости и с поколения $F_1BC_1F_5$ оценивали в поле.

Созданные сложные гибриды F_5 уже по фенотипу были стабильными, хотя в пределах популяции некоторых из них находили отдельные растения, немного (на 2-3 дня) отличавшиеся вегетационным периодом от большинства растений популяции. Проводили отбор растений с фиолетовой окраской зерновки. В популяции F_4 расщепления по этому признаку уже не наблюдали и,

начиная с F_3 , создавали линии. В 2020–2021 гг. изучали гибридные линии поколения F_3 , отобранные по фиолетовой окраске зерна, повышенной устойчивости к ломкости колосового стержня и ряду других селекционно ценных признаков.

Антоцианы выделяли экстракцией в 1-процентном HCl в метаноле из перемолотых зрелых зерен согласно методике P. J. Christie et al. (1994) с модификациями из расчета 1 мл раствора на 200 мг растертого сухого зерна для каждой повторности, тщательно перемешивали. Экстракты оставляли на ночь при $+4^\circ\text{C}$, далее проводили центрифугирование образцов в течение 30 минут при $+4^\circ\text{C}$ при скорости 12 000 об/мин. Отобранный супернатант использовали для количественной оценки общего содержания антоцианов в растворе с помощью спектрофотометра SmartSpec™Plus (BioRad) при длине волны 530 нм. Пересчет из OD530-700 в массовую концентрацию проводили с помощью метода, описанного E. S. M. Abdel-Aal и P. Hucl (1999), с использованием цианидин-3-глюкозида (Cy-3-glu) в качестве стандарта (молярная поглощающая способность $\varepsilon = 25\,965$, молекулярная масса = 449), который является основным представителем антоцианов в фиолетовых зерновках пшеницы (Abdel-Aal et al., 2006). Для каждого образца было сделано три биологических повтора. Достоверность сравнения полученных данных проверяли, применяя критерий Манна – Уитни (U -test).

Фенотипические особенности изучаемого материала гибридных линий и родительских форм следующие:

- 1) сорт полбы 'Гремме' – голозерный, белозерный, длинностебельный, остистый;
- 2) форма полбы из коллекции ВИР (к-25516) – красноколосая, краснозерная, безостая, полупленчатая, длинностебельная;
- 3) селекционная линия из гибрида 31-16 – белоколосая, фиолетовозерная, полуостистая, низкостебельная, слабопленчатая;
- 4) селекционная линия из гибрида 31-16 – белоколосая, фиолетовозерная, безостая, низкостебельная, слабопленчатая;
- 5) селекционная линия из гибрида 31-16 – красноколосая, фиолетовозерная, полуостистая, низкостебельная, слабопленчатая;
- 6) селекционная линия из гибрида 31-19 – красноколосая, фиолетовозерная, полуостистая, низкостебельная, слабопленчатая;

7) селекционная линия из гибрида 31-20 – красноколосая, темнозерная, полуостистая, низкостебельная, слабопленчатая;

8) донор фиолетовой окраски зерна, пшеница TRI 15744 – остистая, низкостебельная, голозерная;

9) селекционная линия из гибрида 27-1 – красноколосая, фиолетовозерная, полуостистая, низкостебельная, слабопленчатая;

10) селекционная линия из гибрида 27-3 – красноколосая, фиолетовозерная, полуостистая, длинностебельная, полупленчатая;

11) селекционная линия из гибрида 27-12 – красноколосая, фиолетовозерная, безостая, длинностебельная, полупленчатая;

12) селекционная линия из гибрида 28-12 – красноколосая, фиолетовозерная, безостая, длинностебельная, полупленчатая.

В процессе структурного анализа растений полбы использовали ранее опубликованный метод определения натуры зерна (Stepochkina, Stepochkin, 2015). Статистическую обработку результатов проводили с помощью t -критерия Стьюдента (Dospekhov, 1985).

Результаты исследований

Все проростки фиолетовоокрашенных зерен пшеницы имеют темно-красный цвет coleoptилей. Данный признак коррелирует с фиолетовой окраской зерна (Gordeeva et al., 2015). Это облегчает контроль и дальнейший отбор растений, на которых завязывались фиолетовоокрашенные зерна. Фенотипическая оценка окраски coleoptилей у изучаемых нами растений показала, что проростки безостой полбы (к-25516), как и тетраплоидной линии-донора *T. aestivum* TRI 15744, обладают ярко выраженной темно-красной окраской coleoptилей, что предполагало присутствие в данных линиях доминантных аллелей гена *Pp-B1* и отсутствие доминантных аллелей второго гена *Pp3*, необходимого для биосинтеза антоцианов в перикарпии.

Для подтверждения фенотипического маркера мы использовали микросателлитный маркер *Xgwm0046* к геномной ДНК изучаемых нами гибридов. Результат анализа для ПЦР-маркера *Xgwm0046* с геномной ДНК линии-донора *T. aestivum* TRI 15744, сорта-реципиента 'Гремме', полбы (к-25516) и их гибридов приведены на рисунке 1. Стрелками указаны фрагменты ДНК (дли-

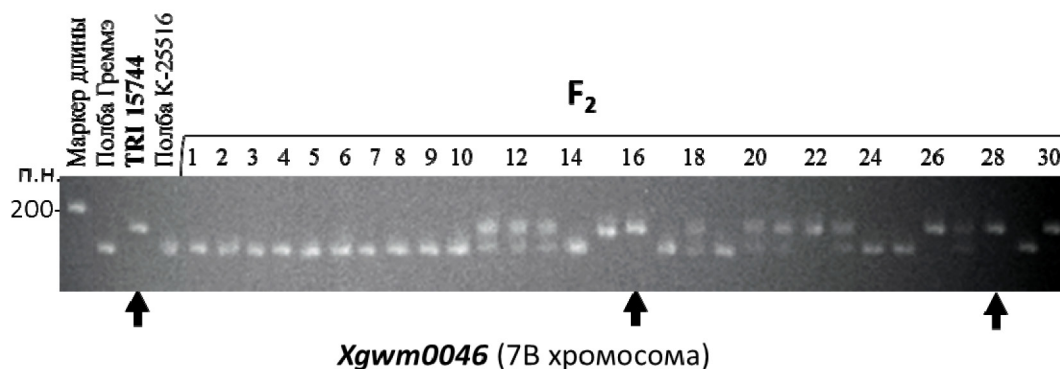


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-маркера *Xgwm0046* с геномной ДНК линии-донора *Triticum aestivum* TRI 15744, сорта-реципиента 'Гремме', полбы (к-25516) и их гибридов поколения F_1F_2 в 5-процентном агарозном геле высокого разрешения

Fig. 1. An electrophoregram of PCR products with the *Xgwm0046* marker for the genomic DNA of the donor line *Triticum aestivum* TRI 15744, recipient cv. 'Gremme', emmer (k-25516), and their hybrids in the 5% high-resolution agarose gel

ной около 186 п.н.), свидетельствующие о наличии доминантных аллелей генов *Pp-B1* от *T. aethiopicum* TRI 15744 в гомозиготном состоянии (растения 16 и 28).

По результатам ПЦР-анализа мы смогли отобрать только гомозиготные формы с аллелями от *T. aethiopicum* TRI 15744. Продукты ПЦР образца полбы к-25516 с окрашенным колеоптилем не отличались от продуктов ПЦР полбы сорта 'Гремме' с неокрашенными колеоптилями. Вероятно, окраска колеоптиля у полбы обусловлена наличием горячей точки рекомбинации между маркером *Xgwm0046* и геном *Pp-B1* на хромосоме 7В. Таким образом, в поколении F_3 высаживали семена от растений с окрашенными колеоптилями.

Для выявления гибридов с доминантными аллелями второго гена фиолетовой окраски перикарпия *Pp3* была использована пара праймеров полиморфного микросателлитного маркера *Xgwm0312*. Результат анализа для ПЦР-маркера *Xgwm0312* с геномной ДНК линии-донора *T. aethiopicum* TRI 15744, сорта-реципиента 'Гремме', полбы (к-25516) и их гибридов поколения F_2 приведен на рисунке 2. Стрелками указаны фрагменты ДНК (длиной около 300 п.н.), свидетельствующие о наличии доминантных аллелей гена *Pp3*, присутствующие в геноме в гомозиготном состоянии (растения: 5, 16, 17, 20, 23, 28 и 29).

ченные как семейства или селекционные линии гибридов № 31, № 27 и № 28.

Определение содержания антоцианов в зерне у изученных форм позволило обнаружить разнообразие форм по этому показателю (рис. 4). Наибольшее содержание антоцианов (82,5 мкг на 1 г цианидин-3-глюкозид) отмечено у линии № 10 гибрида 27-3 (таблица), которая характеризуется средней длины стеблем, полустистым колосом (рис. 5), полуплечатым зерном. У донора фиолетовой окраски зерна – эфиопской пшеницы TRI 15744, антоцианов было меньше – 68,4 мкг/г. Красноколосая линия № 5 гибрида 31-16 также имела повышенное содержание антоцианов (55,5 мкг/г). У белоколосых линий № 3 и № 4 того же гибрида 31-16, количество антоцианов было меньше. Самый низкий показатель этого признака (18,4 мкг/г) среди созданных нами форм полбы отмечен у линии № 9 гибрида 27-1. У родительских форм полбы сорта 'Гремме' и образца к-25516 антоцианов обнаружено менее 5 мкг/г.

Почти у всех изученных форм полбы, кроме сорта 'Гремме', колосовой стержень довольно хрупкий и ломкий, что в полевых условиях приводит к потере урожая зерна при перестое растений в фазе зрелости и при уборке. В таблице представлены данные по некоторым селекционно ценным признакам у линий полбы и их родительских форм. По массе 1000 зерен все они значительно

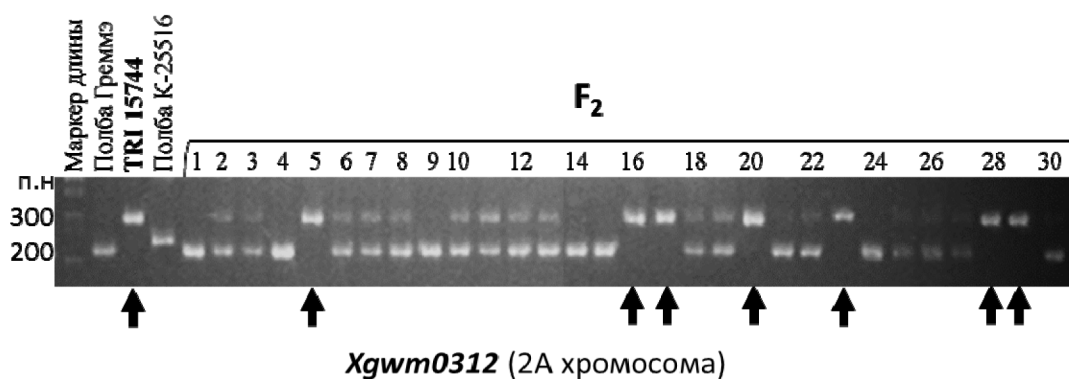


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР маркера *Xgwm0312* с геномной ДНК линии-донора *T. aethiopicum* TRI 15744, сорта-реципиента 'Гремме', полбы (к-25516) и их гибридов в 5-процентном агарозном геле высокого разрешения

Fig. 2. An electrophoregram of PCR products with the *Xgwm0312* marker for the genomic DNA of the donor line *T. aethiopicum* TRI 15744, recipient cv. Gremme', emmer (k-25516), and their hybrids in the 5% high-resolution agarose gel

Таким образом, у растений 16 и 28 присутствовали доминантные аллели двух комплементарных генов *Pp3* и *Pp-B1* в гомозиготном состоянии, то есть оба растения имели генотип *Pp-B1Pp-B1Pp3Pp3*. Однако, несмотря на близость данного маркера к изучаемому гену, надо учитывать, что случаются рекомбинации в точках разрыва между ними. Для достоверности полученного результата были отобраны и посеяны зерна от каждого растения в отдельности и проверено расщепление гибридов последующего поколения по окраске перикарпия.

Среди размножаемых самоопылением потомств фиолетовозерных гибридов в последующих поколениях проводили отбор растений по другим морфологическим признакам. При этом расщепления растений в пределах линии по зерну с фиолетовой окраской не наблюдали, но сами линии различались по интенсивности окрашивания зерна (рис. 3). Для дальнейшей селекции были выбраны потомства с растений поколения $F_1BC_1F_5$, обозна-

уступают голозерному сорту 'Гремме', имевшему значение этого признака $42,3 \pm 2,2$ г. Высокая натура зерна (802 ± 13 г/л) отмечена у линии № 11 гибрида 27-12. По зерновой продуктивности на уровне родительских форм полбы была линия № 9 гибрида 27-1 (389 ± 25 г/м²). У остальных линий этот показатель был ниже.

Полностью голозерных форм, таких как сорт 'Гремме', пока среди селекционного материала не выявлено. Из всех селекционных форм наибольшее количество зерновок без пленок ($86,9 \pm 7,3\%$) вымолочено у линии № 6 гибрида 31-19. Однако продуктивность зерна с делянок у нее низкая по причине небольшой массы 1000 зерен.

Все изученные формы полегли в разной степени. Наибольший показатель устойчивости к полеганию (3–3,5 балла) по 5-балльной шкале имели три низкостебельные (70–82 см) линии гибрида 31-16. Они же обладали и повышенной кустистостью в сравнении с другими формами.

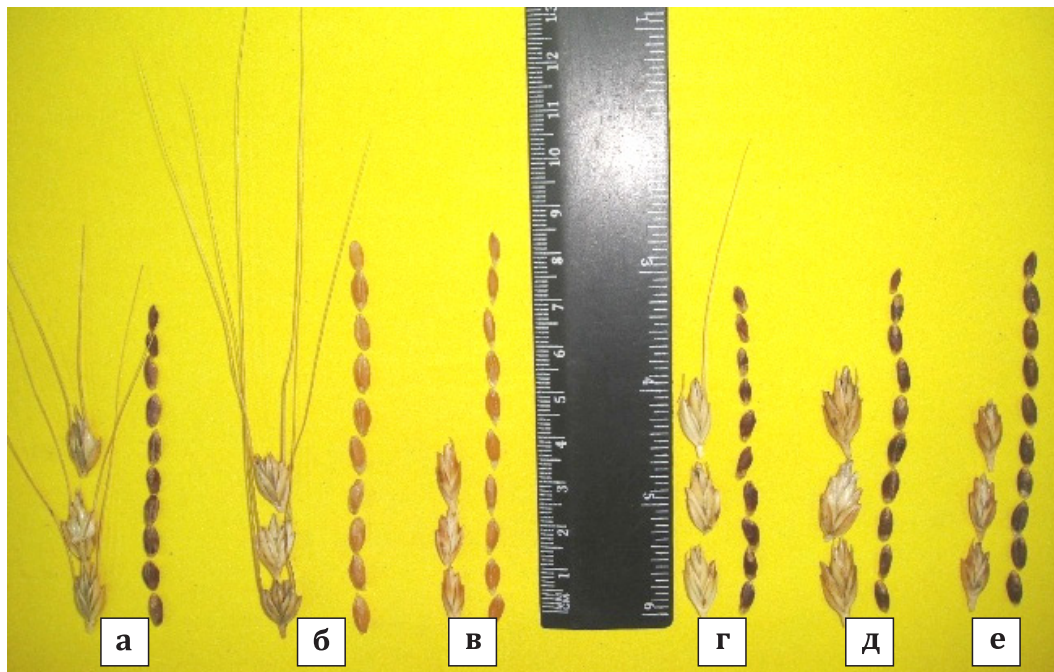


Рис. 3. Колоски и семена родительских форм:

а) фиолетовозерная пшеница TRI 15744; б) голозерная полба сорта 'Греммэ'; в) безостая полба (к-25516).

Колоски и семена фиолетовозерных линий гибридов:

г) белокосый низкостебельный (линия № 6 гибрида 31-19); д) краснокосый низкостебельный (линия № 5 гибрида 31-16); е) краснокосый длинностебельный (линия № 11 гибрида 27-12)

Fig. 3. Spikelets and seeds of the parent forms:

a) purple-grain wheat TRI 15744; б) naked emmer cv. 'Gremme'; в) awnless emmer (к-25516).

Spikelets and seeds of the purple-grain hybrid lines:

г) line No. 6 of the 31-19 hybrid; д) line No. 5 of the 31-16 hybrid; е) line No. 11 of the 27-12 hybrid

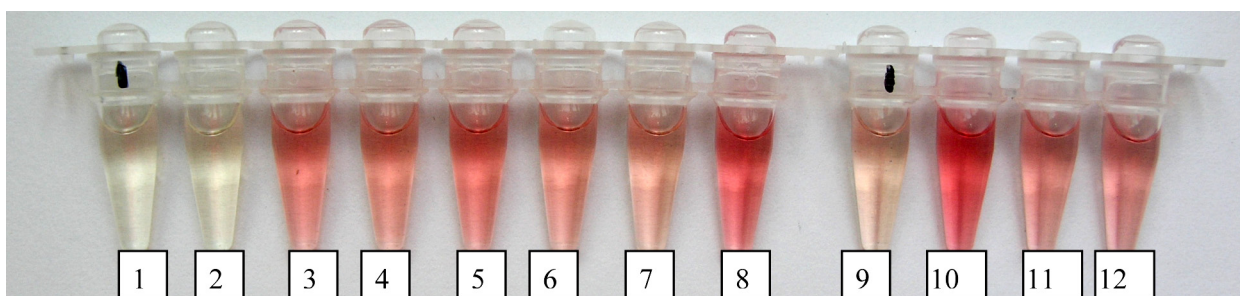


Рис. 4. Наличие антоцианов в фиолетовоокрашенных зернах полбы:

1) 'Греммэ'; 2) к-25516; 3) полуостистая линия № 3 гибрида 31-16; 4) безостая линия № 4 гибрида 31-16; 5) краснокосая линия № 5 гибрида 31-16; 6) линия № 6 гибрида 31-19; 7) линия № 7 гибрида 31-20; 8) эфиопская пшеница TRI 15744; 9) линия № 9 гибрида 27-1; 10) линия № 10 гибрида 27-3; 11) линия № 11 гибрида 27-12; 12) линия № 12 гибрида 28-12

Fig. 4. The presence of anthocyanins in purple-colored emmer grains:

1) 'Gremme'; 2) к-25516; 3) semi-awned line No. 3 of the 31-16 hybrid; 4) awnless line No. 4 of the 31-16 hybrid; 5) red-spike line No. 5 of the 31-16 hybrid; 6) line No. 6 of the 31-19 hybrid; 7) line No. 7 of the 31-20 hybrid; 8) Ethiopian wheat TRI 15744; 9) line No. 9 of the 27-1 hybrid; 10) line No. 10 of the 27-3 hybrid; 11) line No. 11 of the 27-12 hybrid; 12) line No. 12 of the 28-12 hybrid

Таблица. АгронOMICкие характеристики линий полбы и их родителей
Table. Agronomic characteristics of emmer breeding lines and their parents

Название пшеничных форм / Names of wheat forms	Общее содержание антоцианов в зерне, мкг/г Total content of anthocyanins in grain, µg/g	Число продуктивных стеблей, шт. / Number of productive stems, pcs	Длина соломы, см / Straw length, cm	Доля вымоловочных зерен, % / Share of threshed grains, %	Натура зерна, г/л / Test weight of grains, g/l	Масса 1000 зерен, г / 1000 grain weight, g	Урожайность, г/м ² / Grain yield, g/m ²
'Gremma', стандарт / reference	3,7 ± 0,6	2,1 ± 0,2	106,6 ± 2,6	94,6 ± 3,7	766 ± 9	42,3 ± 2,2	492 ± 71
к-25516	4,3 ± 0,7	2,5 ± 0,3	104,7 ± 3,3	14,7 ± 1,9**	768 ± 7	35,4 ± 1,1	368 ± 38
31-16 (линия 3 / line 3)	45,7 ± 15,4**	3,3 ± 0,4	76,6 ± 3,5**	85,0 ± 9,3	772 ± 14	33,1 ± 1,1*	353 ± 16
31-16 (линия 4 / line 4)	43,5 ± 4,02**	3,1 ± 0,7	71,0 ± 2,6**	74,4 ± 14,3	715 ± 15	28,9 ± 3,5	332 ± 34
31-16 (линия 5 / line 5)	55,5 ± 12,2**	3,4 ± 0,4*	82,0 ± 3,8**	41,1 ± 8,2*	758 ± 10	27,7 ± 2,6	282 ± 26*
31-19 (линия 6 / line 6)	39,7 ± 1,4**	1,7 ± 0,3	71,3 ± 2,1**	86,9 ± 7,3	716 ± 16	27,4 ± 3,4	275 ± 41*
31-20 (линия 7 / line 7)	27,5 ± 2,6**	1,8 ± 0,3	70,8 ± 2,1**	73,8 ± 11,0	719 ± 15	27,0 ± 2,3*	267 ± 30*
TRI 15744	68,4 ± 5,8**	1,7 ± 0,3	59,7 ± 2,3**	98,3 ± 2,2	671 ± 17*	25,9 ± 1,0*	218 ± 41*
27-1 (линия 9 / line 9)	18,4 ± 0,4**	2,1 ± 0,4	75,6 ± 2,9*	53,3 ± 11,0	791 ± 17	37,9 ± 2,6	389 ± 25
27-3 (линия 10 / line 10)	82,5 ± 11,6**	2,5 ± 0,4	85,4 ± 3,1**	46,5 ± 10,0*	724 ± 12	29,6 ± 3,9	304 ± 28
27-12 (линия 11 / line 11)	40,1 ± 3,2**	2,2 ± 0,3	95,5 ± 4,4	58,2 ± 6,5*	802 ± 13	31,2 ± 2,2	364 ± 50
28-12 (линия 12 / line 12)	41,0 ± 3,4**	2,3 ± 0,5	98,7 ± 5,4	52,7 ± 8,3*	722 ± 29	29,0 ± 2,3	272 ± 38*

Примечание: достоверные отличия от стандарта: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$
Note: significant differences from the reference: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Рис. 5. Колосья родительских форм:

а) фиолетовозерная пшеница TRI 15744; б) голозерная полба 'Греммэ'; в) безостая полба (к-25516).

Колосья фиолетовозерных гибридов:

г) линия № 6 гибрида 31-19; д) линия № 5 гибрида 31-16; е) линия № 11 гибрида 27-12

Fig. 5. Spikes of the parent forms:

a) purple-grain wheat TRI 15744; б) naked emmer cv. 'Gremme'; в) emmer (k-25516).

Spikes of the purple-grain hybrid lines:

г) line No. 6 of the 31-19 hybrid; д) line No. 5 of the 31-16 hybrid; е) line No. 11 of the 27-12 hybrid

Обсуждение результатов

Повторы простых последовательностей ДНК (SSR) являются предпочтительными молекулярными маркерами в селекции растений из-за их распространенности, надежности, высокой воспроизводимости, высокой эффективности обнаружения вариаций. Такой высокий уровень полиморфизма обусловлен появлением различного количества повторов в микросателлитных областях и может быть легко обнаружен с помощью ПЦР (Röder et al., 1998). Их можно использовать для картирования сцепления, QTL и обнаружения генов, популяционной генетики, анализа родословных, филогенетических и эволюционных исследований, регуляции генов и генетических нарушений (Khlestkina, 2014).

Фиолетовая окраска зерна обусловлена комплементарным взаимодействием доминантных аллелей двух генетических систем *Pp3* и *Pp-V1*, локализованных в разных хромосомах (Khlestkina et al., 2009, 2010; Tereshchenko et al., 2012). Гомозиготные формы одновременно по двум доминантным генам у гибридных растений традиционной селекцией в ранних поколениях создать трудно. Получение гомозиготного материала с фиолетовой окраской зерна в ранних гибридных поколениях становится возможным благодаря применению маркер-ориентированной селекции с помощью метода ПЦР (Gordeeva et al., 2020). «С помощью фенотипических и молекулярных маркеров можно проводить отбор по генотипу, тогда как в традиционной селекции отбор индивидуумов для скрещиваний осуществляется только на основе анализа фенотипа» (Khlestkina, 2014, p. 1049). Используя ПЦР-метод и молекулярные маркеры *Xgwm312* удалось в $F_1BC_1F_{2-3}$ выделить гомозиготные по двум доминантным аллелям генов *Pp3* и *Pp-V1* растения, обладающие фиолетовоокрашенными зернами. Этот этап селекционного процесса является узловым для создания гибридных линий, обладающих данным признаком, так как он

проявляется при комплементарном взаимодействии доминантных аллелей этих двух генов. В последующих поколениях отбор растений проводили по другим селекционно важным, но расщепляющимся признакам. Начиная с F_4-F_5 появлялись уже достаточно стабильные по большинству признаков линии.

Среди изученных нами форм по фенотипу к виду *T. dicoccon*, то есть к двузернянке, можно отнести лишь две: образец из мировой коллекции ВИР к-25516 и линию № 11 гибрида 27-12, колоски которых содержат по 2 зерновки. У остальных селекционных форм, а также у сорта 'Греммэ' в колосках нередко завязывалось 3, а иногда даже и 4 зерновки. Тем не менее 'Греммэ' признан как голозерный сорт полбы (Temirbekova et al., 2014), которую Т. Н. Смекалова и В. Д. Кобылянский предложили относить к новому подвиду двузернянки – *Triticum dicoccon* (Schrank) Schübl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. (Smekalova, Kobylansky, 2019). Возможно, что в условиях Западной Сибири проявили активность «спящие гены» одной из родительских форм твердой пшеницы, участвовавшей в происхождении этого сорта. Передать важный признак – голозерность – нашим селекционным формам полностью пока не удалось, так как основной упор на первом этапе создания селекционного материала был сделан на получение растений с фиолетовой окраской зерна.

Выводы

Маркер-ориентированный метод селекции позволил в сложном трехступенчатом скрещивании эфиопской пшеницы и полбы в поколении $F_1BC_1F_{2-3}$ гибридов выделить формы, несущие в гомозиготном состоянии доминантные аллели двух комплементарно взаимодействующих генов *Pp3* и *Pp-V1*, отвечающих за проявление фиолетовой окраски перикарпия зерна. Полученные в последующих поколениях селекционные линии культурной двузернянки с фиолетовоокрашенным зерном характе-

ризуются различным содержанием в нем антоцианов, различной натурой и продуктивностью зерна. Селекционную ценность представляют линии с высокими показателями этих признаков. Основными недостатками созданных форм пшеницы двузернянки с фиолетовоокрашенными зернами пока остаются относительно невысокий урожай зерна, недостаточно прочный колосовой стержень, неполная вымолачиваемость зерновки из цветковых и колосковых чешуй. Однако дальнейшей селекционной работой можно добиться улучшения этих признаков.

References / Литература

- Abdel-Aal E.S.M., Abou-Arab A.A., Gamel T.H., Hucl P., Young J.C., Rabalski I. Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(23):11171-11177. DOI: 10.1021/jf802168c.
- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*. 1999;76(3):350-354. DOI: 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Abdel-Aal E.S.M., Young J.C., Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(13):4696-4704. DOI: 10.1021/jf0606669
- Astadi I.R., Astuti M., Santoso U., Nugraheni P.S. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chemistry*. 2009;112(3):659-663. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.034
- Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. 1994;194(4):541-549. DOI: 10.1007/BF00714468
- Cvorovic J., Tramer F., Granzotto M., Candussio L., Decorti G., Passamonti S. Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;501(1):151-157. DOI: 10.1016/j.abb.2010.05.019
- Dospikhov B.A. Methodology of field trial (with fundamentals of statistical processing of research results) (Metodika polevogo opyta [s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy]). Moscow: Agropromizdat; 1985. [in Russian] (Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Москва: Агропромиздат; 1985).
- Francavilla A., Joye I.J. Anthocyanins in whole grain cereals and their potential effect on health. *Nutrients*. 2020;12(10):2922. DOI: 10.3390/nu12102922
- 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.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (Pp) alleles. *Euphytica*. 2015;203(2):469-476. DOI: 10.1007/s10681-014-1317-8
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2014;4(3):236-244. DOI: 10.1134/S2079059714030022
- Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes. *Cereal Research Communications*. 2009;37(3):391-398. DOI: 10.1556/CRC.37.2009.3.8
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica*. 2010;171(1):65-69. DOI: 10.1007/s10681-009-9994-4
- Kniewel D.C., Abdel-Aal E.S.M., Rabalski I., Nakamura T., Hucl P. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*. 2009;50(1):113-120. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.007
- Lachman J., Orsák M., Pivec V., Jírů K. Antioxidant activity of grain of einkorn (*Triticum monococcum* L.), emmer (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrack]) and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Plant, Soil and Environment*. 2012;58(1):15-21. DOI: 10.17221/300/2011-PSE
- Lap B., Rai M., Tyagi W. Playing with colours: genetics and regulatory mechanisms for anthocyanin pathway in cereals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2021;37(1):1-29. DOI: 10.1080/02648725.2021.1928991
- Pirro M., Lupattelli G., Del Giorno R., Schillaci G., Berisha S., Mannarino M.R. et al. Nutraceutical combination (red yeast rice, berberine and policosanols) improves aortic stiffness in low/moderate risk hypercholesterolemic patients. *PharmaNutrition*. 2013;1(2):73-77. DOI: 10.1016/j.phanu.2013.02.003
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;91(6-7):1001-1007. DOI: 10.1007/BF00223912
- Pojer E., Mattivi F., Johnson D., Stockley C.S. The case for anthocyanin consumption to promote human health. *A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(5):483-508. DOI: 10.1111/1541-4337.12024
- Prior R.L., Wu X., Gu L., Hager T.J., Hager A., Howard L.R. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(3):647-653. DOI: 10.1021/jf071993o
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):513-523. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149(4):2007-2023. DOI: 10.1093/genetics/149.4.2007
- Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):333-342. [in Russian] (Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):333-342). DOI: 10.18699/VJ18.369
- Smekalova T.N., Kobylansky V.D. A new subspecies of wheat: *Triticum dicoccon* (Schrack) Schuebl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(4):148-151. [in Russian] (Смекалова Т.Н., Кобылянский В.Д. Новый подвид пшеницы *Triticum dicoccon* Schrank subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):148-151). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-148-151
- Stepochkina N.I., Stepochkin P.I. Use of microchondrometer for determination of grain nature of single plants of triticale and wheat. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(11):39-40. [in Russian] (Стёпочкина Н.И., Стёпоч-

- кин П.И. Использование микропушки при определении природы зерна отдельных растений. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;29(11):39-40).
- Temirbekova S.K., Ionov E.F., Ionova N.E., Afanaseva Yu.V. Spelt winter and spring using the ancient species of wheat to boost the immune system of the child's body. *Agrarnoye obozreniye = Agrarian Review*. 2014;(6):40-42. [in Russian] [Темирбекова С.К., Ионов Э.Ф., Ионова Н.Э., Афанасьева Ю.В. Спельта озимая и яровая использование древних видов пшеницы для укрепления иммунной системы детского организма. *Аграрное обозрение*. 2014;(6):40-42).
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S., Börner A., Khlestkina E.K. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Research Communications*. 2012;40(3):334-341. DOI: 10.1556/CRC.40.2012.3.2
- Trojan V., Musilová M., Vyhnanek T., Klejdus B., Hanaček P., Havel L. Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis. *Journal of Cereal Science*. 2014;59(1):48-55. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.10.008
- Wang F., Dong Y.X., Tang X.Z., Tu T.L., Zhao B., Sui N. et al. Comparative transcriptome analysis revealing the effect of light on anthocyanin biosynthesis in purple grains of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(13):3465-3476. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05435
- Wang Q., Han P., Zhang M., Xia M., Zhu H., Ma J. et al. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007;16 Suppl 1:295-301.
- Yawadio R., Tanimori S., Morita N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chemistry*. 2007;101(4):1616-1625. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.016
- Zelenskaya O.V., Zelensky G.L., Ostapenko N.V., Tumanyan N.G. Genetic resources of rice (*Oryza sativa* L.) with colored pericarp. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):296-303. [in Russian] [Зеленская О.В., Зеленский Г.Л., Остапенко Н.В., Туманьян Н.Г. Генетические ресурсы риса (*Oryza sativa* L.) с окрашенным перикарпом зерна. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):296-303. DOI: 10.18699/VJ18.363].
- Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*. 1991;56(3):243-258. DOI: 10.1007/BF00042371

Информация об авторах

Пётр Иванович Стёпочкин, доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН, 630501 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. п. Краснообск, ул. С-200, зд. 5/1, а/я 375, petstep@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1136-0469>

Елена Ивановна Гордеева, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, elgordeeva@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409>

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Information about the authors

Petr I. Stepochkin, Dr. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding, a branch of the ICG SB RAS, P.O. Box 375, bldg. 5/1 S-200 St., Krasnoobsk, Novosibirsky District, Novosibirsk Province 630501, Russia, petstep@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1136-0469>

Elena I. Gordeeva, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Akademika Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090 Russia, elgordeeva@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409>

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

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

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила в редакцию 19.09.2022; одобрена после рецензирования 13.03.2023; принята к публикации 01.06.2023. The article was submitted on 19.09.2022; approved after reviewing on 13.03.2023; accepted for publication on 01.06.2023.