

УДК 575.1:577.15:633.111

ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ ПШЕНИЦЫ

© 2014 г. **Е.К. Хлесткина, О.Ю. Шоева, Е.И. Гордеева**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 9 октября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Биосинтез флавоноидных соединений – один из наиболее хорошо изученных метаболических путей растений. Внимание исследователей к биохимическим, физиологическим и генетическим аспектам биосинтеза флавоноидов связано в первую очередь с широким спектром их биологических свойств. Кроме того, система генов биосинтеза флавоноидов является отличной генетической моделью. Благодаря развитию методов молекулярной генетики и геномики в течение последних лет удалось существенно продвинуться в понимании молекулярно-генетических механизмов, контролирующих биосинтез флавоноидов у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В настоящей статье проводится краткий обзор результатов работ, посвященных анализу структурной и функциональной организации генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и ее сородичей.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, фенольные соединения, флавоноиды, антоцианы, проантоцианидины, регуляторные гены, структурные гены, клонирование генов, секвенирование, картирование, экспрессия генов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ

Флавоноиды занимают важное место среди огромного числа соединений растительного происхождения, обозначаемых вторичными метаболитами. Система генов биосинтеза флавоноидов, и в частности флавоноидных пигментов, сыграла неопределимую роль при открытии ряда биологических закономерностей: с ее помощью были описаны основные законы наследования, открыты мобильные элементы и парамутации, выявлены особенности организации метаболических путей и регуляции экспрессии генов растений, обнаружено явление генного сайленсинга (McClintock, 1956; Brink, 1956, 1973; Napoli *et al.*, 1990; Krol *et al.*, 1990; Hollick *et al.*, 1995, 1997; Stam, Scheid, 2005; Hale *et al.*, 2007; Quattrocchio *et al.*, 2008; Winkel, 2008).

Будучи постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, флавоноиды несут значительную функциональную нагрузку, а именно играют важную роль в раз-

витии растений, защите их от патогенов и неблагоприятных климатических факторов, а также выполняют сигнальные функции (Новотельнов, Ежов, 1954; Freed *et al.*, 1976; Debeaujon *et al.*, 2000; Peer, Murphy, 2008).

Значительное повышение концентрации флавоноидов может свидетельствовать о наличии негативного воздействия среды на организм растения (Chalker-Scott, 1999; Farrant, 2000; Nozzolillo *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2002; Lachman *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2009; Gordeeva *et al.*, 2013; Khlestkina, 2013). Влияние неблагоприятных условий окружающей среды приводит к развитию окислительного стресса в клетках растений, а флавоноидные соединения способны противодействовать окислительному стрессу или предупреждать его развитие, защищая тем самым различные клеточные структуры от разрушения. Кроме того, некоторые флавоноиды обладают антимикробными свойствами (см. обзор Khlestkina, 2013).

Огромное разнообразие флавоноидных соединений достигается с помощью согласованного действия свыше 20 ферментов, которые,

действуя поочередно, сначала синтезируют халконы, а затем дают начало различным классам и различным представителям внутри каждого класса (Jende-Strid, 1993; Winkel-Shirley, 2001a, 2002; Winkel, 2008).

Из 12 основных классов флавоноидов 8 (флавоны, флавонолы, ауроны, халконы, флаван-4-олы, катехины, лейкоантоцианидины, проантоцианидины) являются или пигментами, или предшественниками других флавоноидных пигментов. Желтой и/или оранжевой окраской обладают флавоны, гликозиды флавонолов, ауроны и халконы. Красно-коричневые пигменты представлены флорафенами (производными флаван-4-олов) или проантоцианидинами (производными катехинов и лейкоантоцианидинов). Широкую гамму пигментов от розового до красного, синего и фиолетового обеспечивают антоцианидины и их производные антоцианы (Запрометов, 1974, Бриттон, 1986, Winkel-Shirley, 2001a).

У пшеницы накопление флавоноидных пигментов в отдельных тканях влияет на хозяйственно ценные признаки. Например, красная окраска зерна, связанная с высоким содержанием продуктов окисления танинов, создающих водонепроницаемый барьер, препятствует прорастанию зерна на корню (Freed *et al.*, 1976), а сорта пшеницы с красной окраской колоса отличаются большей приспособленностью в регионах с недостаточной теплообеспеченностью вегетационного периода по сравнению с белоколосыми сортами пшеницы (Darwin, 1883; Синская, 1925; Якубцинер, Савицкий, 1947; Мартынов, Добротворская, 1997). Продукты зерновых злаков, содержащих флавоноидные пигменты, в настоящее время все чаще рассматриваются как дополнительные источники антиоксидантных соединений, употребляемых в пищу и необходимых для здоровья человека (Kniewel *et al.*, 2009).

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ РАСТЕНИЙ

В биосинтезе флавоноидов участвуют две основные группы генов: структурные гены, кодирующие необходимые для биосинтеза ферменты, и регуляторные гены, контролирующие

тканеспецифичную экспрессию структурных генов (Winkel-Shirley, 2001b; Jaakola *et al.*, 2002). У многих видов растений описаны мутантные линии, например у ячменя (Jende-Strid, 1993), кукурузы (Dooner *et al.*, 1991), арабидопсиса (Koorneef, 1990; Shirley *et al.*, 1992, 1995; Kubo *et al.*, 1999), в которых биосинтез флавоноидных пигментов блокирован из-за повреждений генов биосинтеза флавоноидов. Наличие таких мутантных линий позволило существенно ускорить выделение нуклеотидных последовательностей структурных и регуляторных генов биосинтеза. Кроме структурных и регуляторных генов, участвующих в биосинтезе флавоноидов, выявлены гены, кодирующие белки-транспортёры, обеспечивающие внутриклеточный транспорт флавоноидных соединений, в частности транспортёры, необходимые для перемещения молекул антоцианов в вакуоли (Chopra *et al.*, 2008).

В отличие от диплоидных видов растений у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) так и не были выделены мутантные линии, в которых был бы полностью блокирован биосинтез флавоноидных пигментов. Это обусловлено аллополиплоидной (гексаплоидной) природой мягкой пшеницы ($2n = 6x = 42$, ВВААDD), в связи с чем каждый ген в геноме пшеницы представлен как минимум тремя ортологичными (гомеологичными) копиями. Функциональная мутация в одной или даже двух гомеологичных копиях одного и того же гена не может иметь проявления на фенотипическом уровне, благодаря полноценной работе другой (других) копии данного гена. Это справедливо в отношении медленно эволюционирующих структурных генов биосинтеза флавоноидов. В отличие от структурных генов регуляторные гены эволюционируют с большей скоростью (Rauscher, 2008), что объясняет более высокую встречаемость мутантных аллелей регуляторных генов. Различные сочетания аллелей регуляторных генов лежат в основе наблюдаемого разнообразия сортов мягкой пшеницы по признакам окраски. Большинство известных на данный момент генов, определяющих фенотип пшеницы по признакам окраски, представлены в виде гомеологичных копий в субгеномах А, В и D (табл. 1).

Развитие методов структурно-функциональной геномики позволило в настоящее время выйти на новый уровень изучения генов био-

Таблица 1

Гены, определяющие фенотип пшеницы по признакам окраски, их геномная и хромосомная локализация (в скобках) у разных видов

| Обозначение признака на русском/английском языке | Геном А | Геномы В или S | Геном D |
|--|--|--|---------------------------------------|
| Красная окраска зерна/Red grain | <i>R-A1</i> (3A) ^{Ta, Td} | <i>R-B1</i> (3B) ^{Ta, Td} | <i>R-D1</i> (3D) ^{Ta, At} |
| Красная, черная или серо-дымчатая окраска колоса/ Red, black or smokey-grey glume | <i>Rg-A1</i> (1A) ^{Ta, Td, Tt, Tm} | <i>Rg-B1</i> (1B) ^{Ta, Td} | <i>Rg-D1</i> (1D) ^{Ta, At} |
| Красная или черная окраска остей/ Red or black awns | <i>QRaw.ipk-1A</i> (1A) ^{Td} и <i>Bla1</i> (1A) ^{Td} | <i>QRaw.ipk-1B</i> (1B) ^{Td} | <i>QRaw.ipk-1D</i> (1D) ^{At} |
| Красная окраска coleoptile/ Red coleoptile | <i>Rc-A1</i> (7A) ^{Ta, Td, Tb} | <i>Rc-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Rc-S1</i> | <i>Rc-D1</i> (7D) ^{Ta, At} |
| Пурпурная окраска стебля/ Purple culm | <i>Pc-A1</i> (7A) ^{Ta} | <i>Pc-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Pc-S1</i> (7S) ^{As} | <i>Pc-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Пурпурная окраска пыльников/ Purple anther | <i>Pan-A1</i> (7A) ^{Td} | <i>Pan-S1</i> (7S) ^{As} | <i>Pan-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Пурпурная окраска листовых пластинок/ Purple leaf blade | <i>Plb-A1</i> (7A) ^{Ta} | <i>Plb-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Plb-S1</i> (7S) ^{As} | <i>Plb-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Пурпурная окраска листовых влагалищ/ Purple leaf sheath | <i>Pls-A1</i> (7A) ^{Ta} | <i>Pls-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Pls-S1</i> (7S) ^{As} | <i>Pls-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Пурпурная окраска перикарпа/ Purple pericarp | * <i>Pp-A1</i> (7A) ^{Ta} и <i>Pp3</i> (2A) ^{Ta, Td, Tt} | <i>Pp-B1</i> (7B) ^{Td} и <i>Pp-S1</i> (7S) ^{As} | <i>Pp-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Пурпурная окраска колоса/Purple glume | <i>Pg</i> (2A) ^{Td} | Нет | Нет |
| Красная окраска ушек листового влагалища/Red auricle | Нет | <i>Ra2</i> (4B) ^{Ta} и <i>Ra3</i> (6B) ^{Ta} | ** <i>Ra-D1</i> (7D) ^{Ta} |
| Голубая окраска алейронового слоя зерна/ Blue aleurone | <i>Ba</i> (4A) ^{Tb} | Нет | Нет |

Примечание. Модифицировано по: Хлесткина (2012). * Gordeeva *et al.* (2014); ** Khlestkina *et al.* (2014).
^{Ta} – *T. aestivum*, ^{Tb} – *T. boeoticum*, ^{Td} – *T. durum*, Tm – *T. monococcum*, ^{Tt} – *T. timopheevii*, ^{Tu} – *T. urartu*, ^{As} – *Ae. speltoides*,
^{At} – *Ae. tauschii*.

синтеза флавоноидов: выделены нуклеотидные последовательности некоторых структурных и регуляторных генов, изучена их структурно-функциональная организация, показано, что регуляция биосинтеза флавоноидов у пшеницы имеет свои специфические особенности по сравнению с ранее изученными модельными видами растений.

СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ ПШЕНИЦЫ

Pal, *C4h*, *4Cl*, *Chs*. Предшественниками всех флавоноидных соединений являются халконы, синтез которых начинается с фенилаланина и происходит при участии четырех структурных

генов, *Pal*, *C4h*, *4Cl* и *Chs*, кодирующих ферменты фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат 4-гидроксилазу (C4H), 4-кумарат:КоА лигазу (4CL) и халконсинтазу (CHS) соответственно (рис.). У пшеницы идентифицировано по 6 копий каждого из двух генов, *Pal* и *Chs*, выделены частичные последовательности отдельных копий (табл. 2). Гены *C4h* и *4Cl* остаются у пшеницы неизученными.

Из халконов образуются все остальные классы флавоноидных соединений (рис.), среди них относительно хорошо изучены с генетической точки зрения пути биосинтеза антоцианов и проантоцианидинов. Начальные этапы синтеза этих соединений проходят при участии одних и тех же основных генов: *Chi*, *F3h*, *Dfr*.

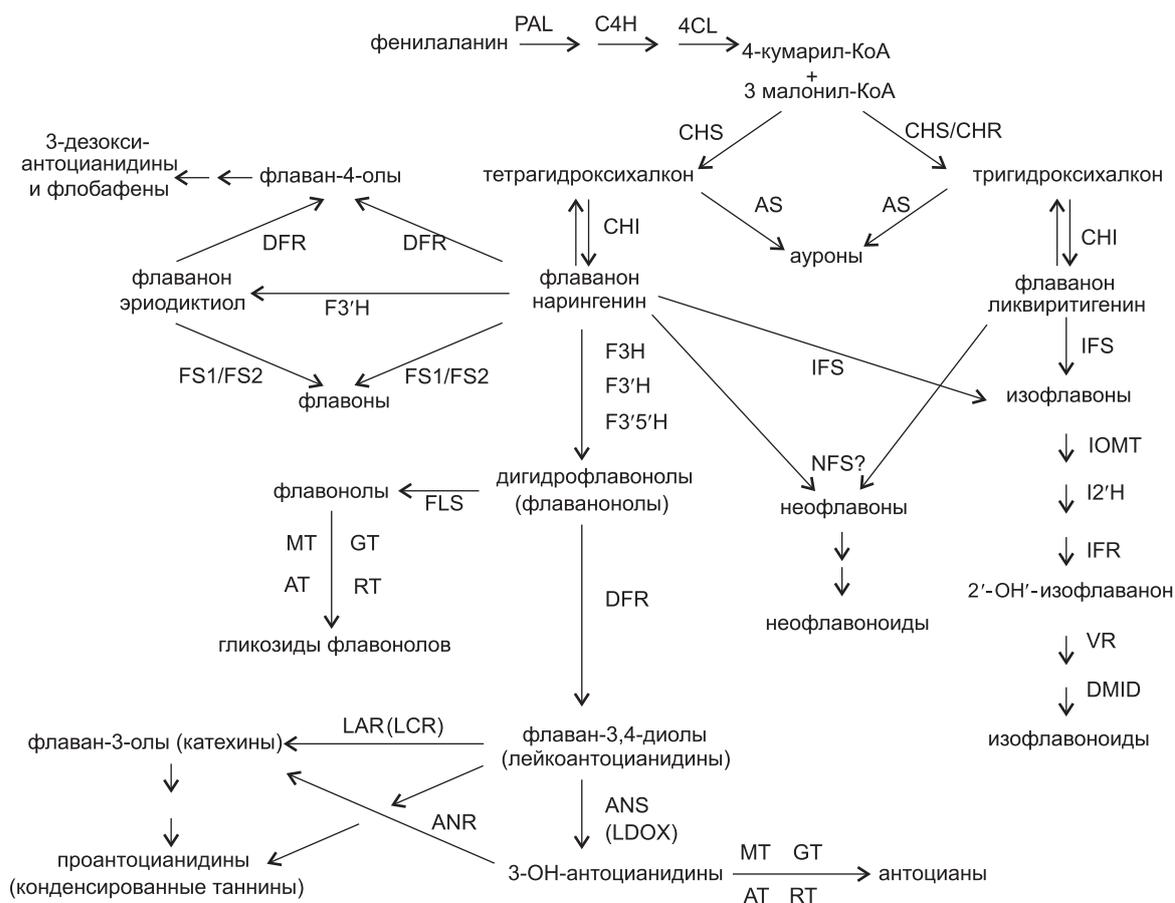


Рис. Схема биосинтеза флавоноидных соединений.

4CL – 4-кумарат:КоА лигаза; ANR – антоцианидинредуктаза; ANS (LDOX) – антоцианидинсинтаза (лейкоантоцианидиндиоксигеназа); AS (AUS) – ауреузидинсинтаза; AT – ацетилтрансфераза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHR – халконредуктаза; C4H – циннамат-4-гидроксилаза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; DMID – 7,2'-дигидрокси-4'-метоксиизофлаванолдегидратаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза; F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза; FLS – флавонолсинтаза; FS (FNS) – флавоносинтаза; GT – гликозилтрансфераза; I2'H – изофлаван-2'-гидроксилаза; IFR – изофлаванредуктаза; IFS – изофлавоносинтаза; IOMT – изофлаван-О-метилтрансфераза; LAR (LCR) – лейкоантоцианидинредуктаза; MT – метилтрансфераза; NFS – неофлавоносинтаза; PAL – фенилаланинаммиакилаза; RT – рамнозилтрансфераза; VR – веститонредуктаза. Схема построена при использовании данных Бриттон (1986), Jende-Strid (1993), Winkel-Shirley (2002), Winkel (2008), Flavonoid pharmacokinetics (2013).

Chi. Для превращения халконов в флаваноны необходима экспрессия гена *Chi*, кодирующего фермент халконфлаванонизомеразу (CHI) (рис.). В геноме мягкой пшеницы выявлено три копии гена *Chi*, локализованные в хромосомах 5A, 5B и 5D (Li *et al.*, 1999). Недавно из генома пшеницы были выделены полноразмерные нуклеотидные последовательности трех копий гена *Chi* (Shoeva *et al.*, 2014a). Выделенные гены *Chi-A1*, *Chi-B1*, *Chi-D1* картированы в ортологичных районах длинных плеч хромосом 5A, 5B, 5D мягкой пшеницы. Показано, что каждая из выделенных копий является функционально

активной, но в некоторых случаях наблюдаются геном-специфичные особенности регуляции *Chi-1* в ответ на стресс, в частности в ответ на солевой стресс в корнях пшеницы активно экспрессируется *Chi-D1*. Кроме того, наблюдается умеренная активность А-геномной копии этого гена, тогда как третья копия, *Chi-B1*, не экспрессируется (Shoeva *et al.*, 2014a).

Помимо генов *Chi* мягкой пшеницы, выделены и картированы ортологичные гены ее сородичей: *Chi-A1* диплоидной пшеницы *T. urartu*, *Chi-G1* тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii*, *Chi-S1* донора В-генома пшеницы

Таблица 2

Клонированные и/или картированные к настоящему времени структурные и регуляторные гены биосинтеза флавоноидов пшеницы

| Обозначение гена | Число локусов в геноме пшеницы | Хромосомная/внутрихромосомная локализация | Полностью или частично секвенированные копии (номер в базе данных NCBI) |
|------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Структурные гены | | | |
| <i>Pal</i> | 6 | 3A, 3B, 3D, 6A, 6B, 6D (Li <i>et al.</i> , 1999) | X99705 (Liao <i>et al.</i> , 1996; Li, Liao, 2003) |
| <i>Chs</i> | 6 | 1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D (Li <i>et al.</i> , 1999) | AY286093, AY286095, AY286096, AY286097 (Yang <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Chi</i> | 3 | 5A, 5B, 5D (Li <i>et al.</i> , 1999) 5AL-7, 5BL-9, 5DL-5 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014a) | JN 039037, JN 039038, JN 039039 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014a) |
| <i>F3h</i> | 4 | 2A/2AL-3, 2B/2BL-6 (2 копии), 2D/2DL-6 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2008) | EF463100, DQ233636, EU402957, JN384122 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2008, 2013) |
| <i>F3'5'h</i> | Точное число неизвестно | – | AY519468; (Yang <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Dfr</i> (<i>TaDfr</i>) | 3 | 3A/3AL-3, 3B/3BL-4, 3D/3DL-1 (Himi, Noda, 2004; Munkvold <i>et al.</i> , 2004) | AB162138, AB162139, AB162140; (Himi, Noda, 2004) |
| <i>Ans</i> | Не менее 5 | 6A (2 локуса), 6B (2 локуса), 6D (Himi <i>et al.</i> , 2006) | AB247917, AB247918, AB247919, AB247920, AB247921 (Himi <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Mt</i> (<i>Fmt</i>) | 3 | 1A, 1B, 1D (Li <i>et al.</i> , 1999) | – |
| <i>Rt</i> (<i>3Rt</i>) | Точное число неизвестно | 5B, 5D (Khlestkina <i>et al.</i> , 2009a) | EU815627 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2009a) |
| Регуляторные гены | | | |
| <i>Myc</i> (<i>TaMyc</i>) | Не менее 4 | 2A (2 копии), 2B, 2D (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c) | KJ747954 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c) |
| <i>Myb10</i> (<i>Tamyb10</i>) | 3 | 3A, 3B, 3D (Himi <i>et al.</i> , 2011) | AB191458, AB191459, AB191460 (Himi <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Mpc1</i> | 6 | 5A, 4B, 4D, 7A, 7B, 7D (Li <i>et al.</i> , 1999) | – |

Aegilops speltoides и *Chi-D1* донора D-генома пшеницы *Ae. tauschii* (Shoeva *et al.*, 2014a, b), а также ген *Chi-RI* ржи посевной *Secale cereale* (Khlestkina, Shoeva, 2014).

Обнаружены некоторые особенности эволюции гена *Chi* у злаков. В отличие от большинства однодольных и двудольных видов растений, имеющих 4 экзона и 3 интрона, у злаков трибы Triticeae наблюдается отсутствие третьего интрона гена *Chi*. Вероятно, элиминация данного интрона произошла на начальном этапе эволюции злаков Triticeae. Кроме этого, у ржи утерян

еще и первый интрон (Khlestkina, Shoeva, 2014; Shoeva *et al.*, 2014a). Причина потери интронов гена *Chi* остается невыясненной. По одной из гипотез, элиминация интронов может быть связана с оптимизацией времени, затрачиваемого на транскрипцию и процессинг генов, участвующих в адаптации организмов к экстремальным условиям внешней среды (Shoeva *et al.*, 2014a).

***F3h*, *F3'h*, *F3'5'h*.** Из флаванона при участии гена *F3h*, кодирующего флаванон-3-гидроксилазу (F3H), образуются дигидрофлавонолы (рис.). В образовании различных представителей

дигидрофлавонолов участвуют также гены *F3h* (кодирует флавоноид-3'-гидроксилазу, F3'H) и *F3'5'h* (кодирует флавоноид-3'5'-гидроксилазу, F3'5'H). Эти гены в отличие от *F3h* остаются у пшеницы практически неизученными – выделена лишь одна нуклеотидная последовательность, соответствующая *F3'5'h* (табл. 2).

Из генома пшеницы выделены четыре копии гена *F3h*: три гомеологичные копии, картированные в длинных плечах хромосом 2A (*F3h-A1*), 2B (*F3h-B1*) и 2D (*F3h-D1*), для которых характерны высокая идентичность структурной организации и схожая регуляция экспрессии, и одна паралогичная копия в хромосоме 2B (*F3h-B2*), локализованная в 40 сМ от *F3h-B1* и имеющая существенные отличия от генов *F3h-1* в структурно-функциональной организации (Khlestkina *et al.*, 2008, 2011, 2013). Кроме того, выделены нуклеотидные последовательности из геномов следующих сородичей пшеницы: *T. urartu* (*F3h-A1*), *Ae. speltoides* (*F3h-S1* и *F3h-S2*), *Ae. tauschii* (*F3h-D1*), *T. timopheevii* (*F3h-G2*) и *S. cereale* (*F3h-R1* и *F3h-R2*) (Khlestkina *et al.*, 2008, 2009a, 2011, 2013).

У большинства видов растений ген, кодирующий фермент F3H, присутствует в виде единичной копии. Однако в геномах В и G различных полиплоидных видов пшеницы и у предка геномов В и G *Ae. speltoides*, а также в геноме R ржи посевной выявлено по 2 копии данного гена (Khlestkina *et al.*, 2013). Кластерный анализ дублированных генов *F3h* в различных геномах злаков, а также скрининг около 100 образцов 24 видов трибы Triticeae позволил заключить, что паралог *F3h-2* появился у общего предка данной трибы, а затем у большинства видов подвергся псевдогенизации, сохранившись лишь в геномах В, G, S и R (Khlestkina *et al.*, 2013). Установлено, что у растений, имеющих один из данных геномов, дублированный ген *F3h-2* специфически транскрибируется в корнях и неактивен в перикарпе зерновки, стебле, колеоптиле и листе, где экспрессируется основной ген *F3h-1*, который наоборот неактивен в корнях. *F3h-2* мало отличается от исходной последовательности *F3h-1* в области экзонов и кодирует функциональный фермент F3H. Гораздо более существенные отличия выявлены в структуре промоторов *F3h-1* и *F3h-2*. Возможно, именно тканевая специализация поз-

волила паралогичной копии *F3h-2* сохраниться в геномах В, G, R и S, тогда как у многих других видов Triticeae дублированный ген подвергся псевдогенизации (Шоева, Хлесткина, 2013; Khlestkina *et al.*, 2013).

Dfr. При участии гена *Dfr*, кодирующего дигидрофлавонол-4-редуктазу (DFR), происходит восстановление дигидрофлавонолов до образования лейкоантоцианидинов (рис. 1), которые, в свою очередь, преобразуются в антоцианидины (предшественники антоцианов) или флаван-3-олы (предшественники проантоцианидинов). Ген *Dfr* представлен в геноме пшеницы тремя копиями, локализованными в длинных плечах хромосом 3A, 3B и 3D (Himi, Noda, 2004; Munkvold *et al.*, 2004). Были выделены полно-размерные нуклеотидные последовательности данных генов пшеницы (Himi, Noda, 2004), показаны тканеспецифичные особенности регуляции каждой из копий (Himi, Noda, 2004) и выявлена взаимосвязь некоторых аллелей генов *Dfr* с устойчивостью пшеницы к прорастанию на корню (Bi *et al.*, 2014).

Ans, Anr, Lar. Преобразование лейкоантоцианидинов в антоцианидины осуществляется при участии гена *Ans* (рис.), кодирующего антоцианидинсинтазу (ANS). Установлено, что в геноме мягкой пшеницы присутствуют не менее пяти копий гена *Ans*, выделены их нуклеотидные последовательности, локализованные в хромосомах 6A (2 локуса), 6B (2 локуса) и 6D (1 локус) (табл. 2). Детальный анализ структурно-функциональной организации каждой копии данного гена не проводился, однако изучена общая экспрессия гена *Ans* в различных тканях пшеницы и выявлено увеличение уровня транскрипции в тканях, окрашенных антоцианами (Tereshchenko *et al.*, 2013). Частичная последовательность гена *Ans* выделена также из генома ржи, установлена ее локализация в длинном плече хромосомы 6R (Khlestkina *et al.*, 2009a).

Проантоцианидины являются продуктами полимеризации и окисления флаван-3-олов (рис.), которые, в свою очередь, образуются либо из лейкоантоцианидинов, благодаря экспрессии гена *Lar*, кодирующего лейкоантоцианидинредуктазу (LAR), либо из антоцианидинов при участии гена *Anr*, кодирующего антоцианидинредуктазу (ANR). О числе копий данных генов в геноме пшеницы, их локализа-

ции и структурно-функциональной организации пока ничего не сообщалось.

Mt, Gt, At, Rt. Антоцианы являются продуктами модификации (метилования, гликозилирования, ацетилования и/или рамнозилирования) антоцианидинов при участии генов *Mt*, *Gt*, *At* и *Rt*, кодирующих ферменты метилтрансферазы (MT), гликозилтрансферазы (GT), ацетилтрансферазы (AT) и рамнозилтрансферазы (RT) соответственно (рис.). В отношении перечисленных генов некоторые сведения накоплены лишь о *Mt* (*Fmt*) и *Rt* (*3Rt*) (табл. 2). В частности, ортологичные копии гена *3Rt* картированы в длинных плечах хромосом 5 у пшеницы и ржи и выявлено близкое расположение двух структурных генов биосинтеза флавоноидов *3Rt* и *Chi* (Khlestkina *et al.*, 2009a; Shoeva *et al.*, 2014a, b). Известно, что гены эукариот, отвечающие за последовательные стадии метаболического пути, могут находиться в самых разных участках генома, на разных хромосомах, но могут располагаться и рядом. Однако даже гены, локализованные рядом, как правило, регулируются независимо (Campbell *et al.*, 2005).

Несмотря на то что еще не все структурные гены биосинтеза флавоноидов пшеницы в полной мере изучены, имеющихся данных оказалось достаточно для исследования тканеспецифичной экспрессии некоторых генов в различных частях растений, отличающихся по окраске, что сыграло ключевую роль в установлении особенностей организации регуляторной сети биосинтеза флавоноидов.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ

Наиболее хорошо изученными регуляторными генами биосинтеза флавоноидов являются гены, контролирующие биосинтез пигментов (антоцианов, проантоцианидинов, флорафенов). В регуляции биосинтеза пигментов принимают участие три группы регуляторных факторов: MYB, MYC и WD40. Функциональная роль и взаимодействие этих факторов лучше всего описаны на примере биосинтеза антоцианов (табл. 3).

MYB. Первые MYB-подобные факторы транскрипции, регулирующие биосинтез антоцианов, были открыты в 1987 г. у кукурузы. К

ним относятся факторы, кодируемые генами *C1* (*Colorless 1*), *P1* (*Purple 1*) и *P11* (*Purple leaf 1*) (Paz-Ares *et al.*, 1987; Chandler *et al.*, 1989; Goff *et al.*, 1990; Petroni *et al.*, 2000). У растений в геноме присутствует около 200 различных MYB-подобных генов (Quattrocchio *et al.*, 2008; Dubos *et al.*, 2010). Выделяют четыре класса MYB-подобных факторов транскрипции – 1R (или MYB-родственные), 2R (R2R3-MYB), 3R (R1R2R3-MYB) и 4R (смешанный). Показано, что в биосинтезе антоцианов участвуют R2R3-MYB-факторы (Stracke *et al.*, 2001). На основании гомологии с генами *C1* и *P11* кукурузы были выделены R2R3-MYB-кодирующие гены биосинтеза антоцианов из геномов других растений (табл. 3). Из генома пшеницы гомологичные нуклеотидные последовательности еще не выделены, однако путем гибридизации ДНК гена *C1* кукурузы с геномной ДНК нуллитетрасомных линий пшеницы установлено присутствие высокогомологичных последовательностей, обозначенных *Mpc1*, в хромосомах 4B, 4D, 5A, 7A, 7B, 7D (Li *et al.*, 1999). Данные последовательности, очевидно, соответствуют двум паралогичным генам, представленным в виде трех гомеологичных копий каждый. При этом копия в хромосоме 7D была картирована в коротком плече (Li *et al.*, 1999) в районе, совпадающем с местом локализации кластера генов, детерминирующих антоциановую окраску различных органов пшеницы (листа, *P1b-D1* и *P1s-D1*, стебля, *Pc-D1*, колеоптиле, *Rc-D1*, перикарпа, *Pp-1*, ушек, *Ra-D1*, пыльников, *Pan-D1*) (Khlestkina *et al.*, 2009b, 2010a, 2014; Tereshchenko *et al.*, 2012). Кроме того, показано, что гены, детерминирующие окраску, определяют активность структурных генов биосинтеза антоцианов в соответствующих органах (Khlestkina *et al.*, 2008, 2009a, 2010b, 2014; Tereshchenko *et al.*, 2013). В совокупности имеющиеся данные позволяют отнести гены *P1b-1*, *P1s-1*, *Pc-1*, *Rc-1*, *Pp-1*, *Ra-1*, *Pan-1* пшеницы к семейству R2R3-MYB-кодирующих регуляторных генов биосинтеза антоцианов.

Также установлено, что другой фактор, принадлежащий семейству MYB, участвует в регуляции биосинтеза проантоцианидинов в семенной оболочке пшеницы и кодируется генами *R-A1*, *R-B1* и *R-D1*, локализованными в хромосомах 3A, 3B и 3D (Himi *et al.*, 2005; Himi,

Таблица 3

Характеристики регуляторных факторов, участвующих в биосинтезе антоцианов и кодирующие их гены в геномах основных модельных видов растений, а также в геноме пшеницы

| Тип регуляторных факторов | MYC (bHLH) | | MYB | | WD40 | |
|---|---|---|--|---|--|--|
| Роль фактора в регуляции биосинтеза | Определение тканеспецифичности биосинтеза антоцианов (Taylor, Briggs, 1990) | | Светозависимая регуляция биосинтеза (Taylor, Briggs, 1990) | | Стабилизация комплекса MYB-bHLH (de Vetten <i>et al.</i> , 1997) | |
| Структурный элемент и его функциональное значение | N-конец (а.о. 1–200) | Взаимодействие с MYB (Goff <i>et al.</i> , 1992) | N-конец (а.о. 1–52, повторы R2R3) | Связывание ДНК и димеризация (Romero <i>et al.</i> , 1998) | N-конец (повтор GH) | Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker, Ludwig, 2003) |
| | N-конец (а.о. 201–400) | Взаимодействие с WD40 и/или комплексом RNApolIII (Fegré-d'Amaré <i>et al.</i> , 1994) | | | | |
| | bHLH-домен | Связывание ДНК и димеризация (Heim <i>et al.</i> , 2003) | С-конец | Регуляция экспрессии гена-мишени (Stracke <i>et al.</i> , 2001) | С-конец (повтор WD) | Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker, Ludwig, 2003) |
| | С-конец | Димеризация (Payne <i>et al.</i> , 2000) | | | | |
| Вид | Гены, кодирующие перечисленные факторы у разных видов растений | | | | | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heinh. | <i>TT8</i> (Nesi <i>et al.</i> , 2000) <i>GL3/EGL3</i> (Bernhardt <i>et al.</i> , 2003; Heim <i>et al.</i> , 2003; Zhang <i>et al.</i> , 2003) | | <i>TT2</i> , <i>CPC</i> (Borevitz <i>et al.</i> , 2000; Gonzalez <i>et al.</i> , 2008) <i>MYBL2</i> (Dubos <i>et al.</i> , 2008; Matsui <i>et al.</i> , 2008) | | <i>TTG1</i> (Walker <i>et al.</i> , 1999) | |
| <i>Petunia hybrida</i> L. | <i>AN1</i> , <i>JAF13</i> (Llyod <i>et al.</i> , 1992; Quattrocchio <i>et al.</i> , 1998; Spelt <i>et al.</i> , 2000) | | <i>AN2</i> , <i>AN4</i> (Quattrocchio <i>et al.</i> , 1999, 2006) | | <i>AN11</i> (de Vetten <i>et al.</i> , 1997) | |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>B</i> , <i>R</i> , <i>Lc</i> , <i>Sn</i> , <i>In1</i> (Burr <i>et al.</i> , 1996; Chandler <i>et al.</i> , 1989; Goff <i>et al.</i> , 1990; Consonni <i>et al.</i> , 1993; Petroni <i>et al.</i> , 2000) | | <i>C1</i> , <i>P11</i> , <i>P1</i> (Paz-Ares <i>et al.</i> , 1987; Chandler <i>et al.</i> , 1989; Goff <i>et al.</i> , 1990; Petroni <i>et al.</i> , 2000) | | <i>PAC1</i> (Selinger, Chandler, 1999) | |
| <i>Triticum aestivum</i> L. | <i>TaMycl</i> (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c) | | <i>Mpcl</i> (Li <i>et al.</i> , 1999) | | – | |

Примечание. а.о. – аминокислотные остатки.

Noda, 2005). Показана взаимосвязь между присутствием рецессивного аллеля в локусе *R-B1* и наличием 19-нуклеотидной делеции в последовательности MYB-фактора (*Tamyb10-B1*), приводящей к сдвигу рамки считывания (Himi, Noda, 2005; Himi *et al.*, 2011).

MYC. Другая большая группа регуляторных факторов, контролирующая биосинтез антоцианов, относится к MYC-подобным регуляторным факторам, которые принадлежат к группе регу-

ляторных факторов с bHLH доменом (основным спираль-петля-спираль доменом), распознающим ДНК. Первые MYC-подобные факторы транскрипции, участвующие в биосинтезе антоцианов, были открыты в 1989 г. у кукурузы и представляют собой члены В/Р семейства. Позже на основании гомологии были выделены другие члены данного семейства из геномов кукурузы и других растений (табл. 3). Исследование данных факторов *in vitro* показало, что они способны

активировать транскрипцию генов-мишеней самостоятельно либо в комплексе с MYB-подобными факторами, что зависит от промотора гена-мишени (Mol *et al.*, 1998).

Недавно была впервые выделена и отсекуирована полноразмерная геномная нуклеотидная последовательность гена мягкой пшеницы *TaMyc1*, кодирующая MYC-подобный регуляторный фактор. Установлено, что транскрипционная активность гена *TaMyc1* повышена в тканях пшеницы, окрашенных антоцианами, причем наиболее высокий уровень экспрессии наблюдается в пигментированном перикарпе зерна. В геноме мягкой пшеницы данный ген имеет не менее четырех копий, картированных в длинных плечах хромосом второй гомеологической группы, однако в перикарпе экспрессируется только *TaMyc1*, который колокализуется с одним из генов, детерминирующих антоциановую окраску перикарпа, *Pp3* (Shoeva *et al.*, 2014c). Сравнение экспрессии *TaMyc1* в перикарпе изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, показало, что MYB-кодирующий ген *Pp-D1* частично супрессирует ген *TaMyc1* (Shoeva *et al.*, 2014c). Таким образом, впервые у растений показано, что между регуляторными генами биосинтеза антоцианов существует взаимная регуляция: MYB-кодирующий ген может вызывать частичную супрессию MYC-кодирующего гена. При этом для биосинтеза антоцианов в перикарпе пшеницы требуется комплементарное взаимодействие продуктов генов *Pp-D1* и *Pp3* (Tereshchenko *et al.*, 2012).

WD40. Третья группа факторов, регулирующих биосинтез антоцианов, WD40, содержит белковые повторы, консервативные для животных, растений и дрожжей (Smith *et al.*, 1999). Первый представитель данной группы у растений, *An11*, был описан у петунии. Данный ген кодирует небольшой полипептид с 5–6 консервативными WD-повторами (de Vetten *et al.*, 1997). Мутации в данном гене связаны с отсутствием пигментации. Позднее на основании гомологии были описаны регуляторные гены семейства WD40 у других растений (табл. 3). Из генома пшеницы гомологичные нуклеотидные последовательности пока еще не выделены.

Существенную роль в изучении регуляторных генов пшеницы играет сравнительное исследование генетически и цитологически

маркированных линий (Khlestkina, 2014). В частности, для идентификации и изучения структурно-функциональной организации регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *TaMyb10* (Himi, Noda, 2005; Himi *et al.*, 2011) и *TaMyc1* (Shoeva *et al.*, 2014c) важную роль сыграло использование почти изогенных линий пшеницы, различающихся по окраске семенной оболочки и перикарпа соответственно.

В связи со сложной организацией генома пшеницы изучение ее регуляторных генов до настоящего момента происходило с использованием методов прямой генетики: «от признака к гену». В данное время реализуется проект по секвенированию полного генома пшеницы (<http://www.wheatgenome.org/>), бурно развивается приборно-аналитическая база для автоматизированного анализа метаболитов и расширяется спектр эффективных методов направленного изменения нуклеотидных последовательностей *in vivo* (Christian *et al.*, 2010; Cermak *et al.*, 2011; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). В обозримом будущем все это обеспечит возможность широкого использования подходов не только прямой, но и обратной генетики для выделения и детального анализа других регуляторных генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и реконструкции регуляторной сети данного метаболического пути с учетом ее видоспецифичных особенностей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья подготовлена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ гранта 14-04-31637), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук (МД_2615.2013.4) и государственной бюджетной программы VI.53.1.5.

ЛИТЕРАТУРА

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 422 с.
- Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. шк., 1974. 214 с.
- Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Особенности распространения морфологических признаков колоса мягкой пшеницы на территории бывшего СССР // Генетика. 1997. Т. 33. С. 350–357.
- Новотельнов Н.В., Ежов И.С. Об антибиотических и ан-

- тиокислительных свойствах желтых пигментов зерна // Докл. АН СССР. 1954. Т. 99. С. 297–300.
- Синская Е. О полевых культурах Алтая (краткий отчет о поездке летом 1924 г.) // Тр. прикл. ботан. селекции. 1925. Т. 14. С. 359–376.
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. С. 202–216.
- Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Экспрессия гена *F3h* в различных органах пшеницы // Молекуляр. биология. 2013. Т. 47. С. 1028–1030.
- Якубцинер М.М., Савицкий М.С. Зерновые культуры // Руководство по апробации с.-х. культур. М.: Сельхозгиз, 1947. С. 20.
- Bernhardt C., Lee M.M., Gonzalez A., Zhang F., Lloyd A., Schiefelbein J. The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root // *Development*. 2003. V. 130. P. 6431–6439.
- Bi H.H., Sun Y.W., Xiao Y.G., Xia L.Q. Characterization of *DFR* allelic variations and their associations with pre-harvest sprouting resistance in a set of red-grained Chinese wheat germplasm // *Euphytica*. 2014. V. 195. P. 197–207.
- Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. Activation tagging identified a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 2383–2393.
- Brink R.A. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible // *Genetics*. 1956. V. 41. P. 872–889.
- Brink R.A. Paramutation // *Annu. Rev. Genet.* 1973. V. 7. P. 129–152.
- Burr F.A., Burr B., Scheffler B.E., Blewitt M., Wienand U., Matz E.C. The maize repressor-like gene *intensifier 1* shares homology with the r1/b7 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 1249–1259.
- Campbell P.N., Smith A.D., Peters T.J. Biochemistry illustrated: Biochemistry and Molecular Biology in the Post-Genomic Era. Edinburgh; N.Y.: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 264 p.
- Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting // *Nucl. Acids Res.* 2011. 39. P. e82.
- Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 1–9.
- Chandler V.L., Radicella J.P., Robbins T.P., Chen J., Turks D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences // *Plant Cell*. 1989. V. 1. P. 1175–1183.
- Chopra S., Hoshino A., Boddu J., Iida S. Flavonoid pigments as tools in molecular genetics // *The Science of Flavonoids* / Ed. E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 147–173.
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases // *Genetics*. 2010. V. 186. P. 757–761.
- Cong L., Ran A.F., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. P. 819–823.
- Consonni G., Geuna F., Gavazzi G., Tonelli C. Molecular homology among members of the R gene family in maize // *Plant J.* 1993. V. 3. P. 335–346.
- Darwin C. The variation of animals and plants under domestication. N.Y.: D.Appelton & Co, 1883. 495 p.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 403–414.
- Dooner H.K., Kermicle J.L. Displaced and tandem duplications in the long arm of chromosome 10 in maize // *Genetics*. 1976. V. 82. P. 309–322.
- Dooner H.K., Robbins T.P., Jorgensen R.A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis // *Annu. Rev. Genet.* 1991. V. 25. P. 173–179.
- Dubos C., Le Gourriec J., Baudry A., Lanet E., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Alboresi A., Weisshaar B., Lepiniec L. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2008. V. 55. P. 940–953.
- Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis* // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 573–581.
- Farrant J.M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species // *Plant Ecol.* 2000. V. 151. P. 29–39.
- Ferré-D'Amaré A.R., Pognonec P., Rüder R.G., Burley S.K. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 180–189.
- Flavonoid Pharmacokinetics / Eds N.M. Davies, J.A. Yanez. Hoboken; New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013. P. 7.
- Freed R.D., Everson E.H., Ringlund K., Gullord M. Seed coat color in wheat and the relationship to seed dormancy at maturity // *Cereal Res. Commun.* 1976. V. 4. P. 147–149.
- Goff S.A., Cone K.C., Chandler V.L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 864–875.
- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings // *Plant J.* 2008. V. 53. P. 814–827.
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., E.K. Khlestkina E.K. Cold stress response of wheat genotypes having different *Rc* alleles // *Cereal Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 519–526.
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of *Pp* (*purple pericarp*) alleles // *Euphytica*. 2014. DOI: 10.1007/s10681-014-1317-8.
- Hale C.J., Stonaker J.L., Gross S.M., Hollick J.B. A novel Snf2 protein maintains trans-generational regulatory states established by paramutation in maize // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. P. e275.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20.

- P. 735–747.
- Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for *Tamyb10* related to *R-1*, red grain color gene in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011. 11 p. ID 369460.
- Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome.* 2005. V. 48. P. 747–754.
- Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 365–375.
- Himi E., Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor // *Euphytica.* 2005. V. 143. P. 239–242.
- Himi E., Osaka T., Noda K. 2006. Isolation and characterization of wheat *ANS* genes. GenBank 2006, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=himi%20osaka%20noda&cmd=Search&db=nucore&QueryKey=4]
- Hollick J. B., Dorweiler J.E., Chandler V.L. Paramutation and related allelic interactions // *Trends Genet.* 1997. V. 13. P. 302–308.
- Hollick J.B., Patterson G.I., Coe E.H., Cone K.C., Chandler V.L. Allelic interactions heritably influence the activity of a metastable maize *pl* allele // *Genetics.* 1995. V. 141. P. 709–719.
- Jaakola L., Määttä K., Pirtillä A.M., Törrönen R., Kärenlampi S., Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 729–739.
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley // *Hereditas.* 1993. V. 119. P. 187–204.
- Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals // *Cereal Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 185–198.
- Khlestkina E.K. Current applications of wheat and wheat-alien precise genetic stocks // *Mol. Breed.* 2014. V. 34. P. 273–281.
- Khlestkina E.K., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A. Diversification of the duplicated *F3h* genes in Triticeae // *J. Mol. Evol.* 2013. V. 76. P. 261–266.
- Khlestkina E.K., Gordееva E.I., Arбузова V.S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line ‘i:S29Ra’ having intensive anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles // *Plant Breed.* 2014. V. 133. P. 454–458.
- Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes // *Cereal Res. Commun.* 2009b. V. 37. P. 391–398.
- 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.* 2010a. V. 171. P. 65–69.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Pshenichnikova T.A., Börner A. Functional diversity at *Rc* (red coleoptile) locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Mol. Breed.* 2010b. V. 25. P. 125–132.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat // *BMC Plant Biol.* 2008. V. 8. P. 88.
- Khlestkina E.K., Salina E.A., Matthies I., Leonova I.N., Börner A., Röder M.S. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley // *Euphytica.* 2011. V. 179. P. 333–341.
- Khlestkina E.K., Shоеva O.Y. Intron loss in the chalcone-flavanone isomerase gene of rye // *Mol. Breed.* 2014. V. 33. P. 953–959.
- Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Yu., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids // *Mol. Genet. Genom.* 2009a. V. 282. P. 475–485.
- Kniviel D.C., Abdel-Aal E.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.) // *J. Cereal Sci.* 2009. V. 50. P. 113–120.
- Koornneef M. Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis* // *Arabidopsis Inf. Serv.* 1990. V. 27. P. 1–4.
- Krol van der A.R., Mur L.A., de Lange P., Mol J.N., Stuitje A.R. Inhibition of flower pigmentation by antisense *CHS* genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect // *Plant Mol. Biol.* 1990. V. 14. P. 457–466.
- Kubo H., Peeters A.J.M., Aarts M.G.M., Pereira A., Koornneef M. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1217–1226.
- Lachman J., Dudjak J., Miholová D., Kolihová D., Pivec V. Effect of cadmium on flavonoid content in young barley (*Hordeum sativum* L.) plants // *Plant Soil Environ.* 2005. V. 51. P. 513–516.
- 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. V. 98. P. 226–233.
- Li H.P., Liao Y.C. Isolation and characterization of two closely linked phenylalanine ammonia-lyase genes from wheat // *Yi. Chuan. Xue. Bao.* 2003. V. 30. P. 907–912.
- Liao Y.C., Li H.P., Kreuzaler F., Fischer R. Nucleotide sequence of one of two tandem genes encoding phenylalanine ammonia-lyase in *Triticum aestivum* // *Plant Physiol.* 1996. V. 112. No. 3. P. 1398–1398.
- Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *Cl* // *Science.* 1992. V. 258. P. 1773–1775.
- Mali P., Esvelt K.M., Churej G.M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology // *Nature Methods.* 2013. V. 10. P. 957–963.
- Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2008. V. 55. P. 954–967.
- McClintock B. Controlling elements and the gene // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1956. V. 21. P. 197–216.
- Mol J., Grotewold E., Koes R. How genes paint flowers and seeds // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 212–217.
- Munkvold J.D., Greene R.A., Bermudez-Kandianis C.E., LaRota C.M., Edwards H., Sorrells S.F., Dake T., Benschler D., Kantety R., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J., Akhunov E.D., Dvorak J., Miftahudin, Gustafson J.P., Pathan M.S., Nguyen H.T., Matthews D.E., Chao S., Lazo G.R., Hummel D.D., Anderson O.D., Anderson J.A., Gonzalez-Hernandez J.L., Peng J.H., Lapitan N., Qi L.L., Echalié B.,

- Gill B.S., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Sandhu D., Erayman M., Gill K.S., McGuire P.E., Qualset C.O., Sorrells M.E. Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1 // *Genetics*. 2004. V. 168. P. 639–650.
- Nagata T., Yamada H., Du Z., Todoriki S., Kikuchi S. Microarray analysis of genes that respond to gamma-irradiation in *Arabidopsis* // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 1022–1030.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 279–289.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques* // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1863–1878.
- Nozzolillo C., Isabelle P., Andersen O.M., Abou-Zaid M. Anthocyanins of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings // *Can. J. Bot.* 2002. V. 80. P. 796–801.
- Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 // *Genetics*. 2000. V. 156. P. 1349–1362.
- Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3553–3558.
- Peer W.A., Murphy A.S. Flavonoids as signal molecules // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 239–268.
- Petroni K., Cominelli E., Consonni G., Gusmaroli G., Gavazzi G., Tonelli C. The developmental expression of the maize regulatory gene *Hopi* determines germination-dependent anthocyanin accumulation // *Genetics*. 2000. V. 155. P. 323–336.
- Plaza B.M., Jimenez S., Segura M.L., Contreras J.I., Lao M.T. Physiological stress caused by salinity in cordyline fruticosa and its indicators // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2009. V. 40. P. 473–484.
- Quattrocchio F., Wing J.F., van der Woude K., Mol J.N.M., Koes R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes // *Plant J.* 1998. V. 13. P. 475–488.
- Quattrocchio F., Wing J., van der Woude K., Souer E., de Vetten N., Mol J., Koes R. Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 1433–1444.
- Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1274–1291.
- Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. The regulation of flavonoid biosynthesis // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 97–122.
- Rausher M.D. The evolution of flavonoids and their genes // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 175–211.
- Romero I., Fuertes A., Benito M.J., Malpica J.M., Leyva A., Paz-Ares J. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1998. V. 14. P. 273–284.
- Ryan K.G., Swinny E.E., Markham K.R., Winefield C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves // *Phytochemistry*. 2002. V. 59. P. 23–32.
- Selinger D.A., Chandler V.L. Major recent and independent changes in the levels and patterns of expression have occurred at the *b* gene, a regulatory locus in maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 15007–15012.
- Shirley B.W., Hanley S., Goodman H.M. Effect of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations // *Plant Cell*. 1992. V. 4. P. 333–347.
- Shirley B.W., Kubasek W.L., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel F.M., Goodman H.M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 659–671.
- Shoeva O.Y., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A., Khlestkina E.K. Functional divergence between the B, S and G genomes estimated using wheat introgression lines // *Genetica*. 2014b. Under review.
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in wheat pericarp // *Molecules*. 2014c. V. 19. P. 20266–20279.
- Shoeva O.Y., Khlestkina E.K., Berges H., Salina E.A. The homoeologous genes encoding chalcone-flava-none isomerase in *Triticum aestivum* L.: structural characterization and expression in different parts of wheat plant // *Gene*. 2014a. V. 538. P. 334–341.
- Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. The WD repeat: a common architecture for diverse functions // *Trends Biochem. Sci.* 1999. V. 24. P. 181–185.
- Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1619–1631.
- Stam M., Scheid O.M. Paramutation: an encounter leaving a lasting impression // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 283–290.
- Stracke R., Werber M., Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. V. 4. P. 447–456.
- Taylor L.P., Briggs W.R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 115–127.
- Tereshchenko O.Y., Arbutova V.S., Khlestkina E.K. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes // *J. Cereal Sci.* 2013. V. 57. P. 10–13.
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbutova V.S., Börner A., Salina E.A., Khlestkina E.K. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat // *Cereal Res. Commun.* 2012. V. 40. P. 334–341.
- Van Nocker S., Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function // *BMC Genomics*. 2003. V. 4. P. 50.

- Vetten de N., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 1422–1434.
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1337–1350.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology // *Plant Physiol.* 2001a. V. 126. P. 485–493.
- Winkel-Shirley B. It takes garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism // *Plant Physiol.* 2001b. V. 127. P. 1399–1404.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // *Cur. Op. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 218–223.
- Winkel B.S.J. The biosynthesis of flavonoids // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 71–95.
- Yang G., Li B., Gao J., Liu J., Zhao X., Zheng Q., Tong Y., Li Z. Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-Hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway // *J. Integr. Plant Biol. (Acta Bot. Sin.)*. 2004. V. 46. P. 588–594.
- Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne T., Lloyd A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* // *Development.* 2003. V. 130. P. 4859–4869.

FLAVONOID BIOSYNTHESIS GENES IN WHEAT

E.K. Khlestkina, O.Y. Shoeva, E.I. Gordeeva

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Summary

The biosynthesis of flavonoid compounds is one of the best-studied metabolic pathways in plants. The researchers' attention to the biochemical, physiological and genetic aspects of flavonoid biosynthesis is associated primarily with the wide range of their biological properties. In addition, the flavonoid biosynthesis gene system is an excellent genetic model. Owing to the development of molecular and genomic methods in recent years, considerable progress is made in the understanding of the molecular and genetic mechanisms underpinning flavonoid biosynthesis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). This article provides a brief overview of the results of research in the structural and functional organization of flavonoid biosynthesis genes in wheat and its relatives.

Key words: secondary metabolites, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, regulatory genes, structural genes, gene cloning, sequencing, mapping, gene expression.