

Научный обзор

Молекулярно-генетические основы доместикации риса: контроль осыпаемости семян, размера зерна и окраски перикарпия

Н.А. Миргородский¹, С.А. Слезова¹, Н.А. Добаркина¹, Т.В. Матвеева^{2,3}, Е.А. Андреева²

¹ Научно-технологический университет Сириус, Сочи, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, г. Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Доместикация риса (*Oryza sativa* L.) как одной из пяти древнейших хлебных культур сопровождалась формированием «синдрома доместикации», включающего утрату естественного рассеивания семян, увеличение размеров и изменение окраски зерна, сокращение периода покоя и переход к однолетнему циклу. На основе археологических, физиолого-генетических и молекулярных данных обобщены механизмы, лежащие в основе ключевых агрономических признаков. Снижение осыпаемости связано с мутациями и аллельной диверсификацией локусов *SH4*, *qSH1*, *SH5*, *SHAT1*, *CPL1*, *OsSh1 / ObSH3*, *ObSH11*, *NPC1*, *OSH15*, *GRF4* и *OsLG1 / SPR3*, которые регулируют закладку и деградацию отделительного слоя колосков. Размер зерна контролируется QTL *GW2*, *GS3*, *GS5* и *TGW6*, определяющими клеточное деление и развитие эндосперма, что напрямую влияет на массу тысячи зерен и урожайность. Окраску перикарпия задают гены *Rc* и *Rd*, а также кассета *Kala1–Kala3–Kala4*; структурные перестройки промотора *Kala4* индуцируют эктопическую экспрессию bHLH-фактора и накопление антоцианов, тогда как делеция 14 п. н. в *Rc* перевела большинство сортов к белому типу зерна и впоследствии была функционально восстановлена методом CRISPR/Cas9. Совокупность представленных сведений формирует генетическую основу для направленного повышения урожайности, технологической пригодности и нутритивной ценности современных сортов риса.

Ключевые слова: рис; доместикация; осыпаемость семян; размер зерна; окраска перикарпия; гены *SH4*, *qSH1*, *GW2*, *GS3*, *Rc*; антоцианы; селекция.

Molecular-Genetic Foundations of Rice Domestication: Control of Seed Shattering, Grain Size, and Pericarp Coloration

Nikita A. Mirgorodskii¹, Sofya A. Slezova¹, Nadezhda A. Dobarkina¹, Tatiana V. Matveeva^{2,3}, Elena A. Andreeva²

¹ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

³ All-Russian Research Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Domestication of rice (*Oryza sativa* L.), one of the five earliest cereal crops, gave rise to a characteristic “domestication syndrome” marked by loss of natural seed dispersal, enlargement and colour change of the caryopsis, shortening of seed dormancy, and transition to an annual life cycle. Archaeological, physiological-genetic and molecular evidence is synthesised here to summarise the mechanisms underlying these key agronomic traits. Reduced seed shattering is linked to mutations and allelic diversification at loci *SH4*, *qSH1*, *SH5*, *SHAT1*, *CPL1*, *OsSh1/ObSH3*, *ObSH11*, *NPC1*, *OSH15*, *GRF4* and *OsLG1/SPR3*, which govern formation and degradation of the spikelet abscission layer. Grain size is determined by QTL *GW2*, *GS3*, *GS5* and *TGW6*, modulating cell division and endosperm development and thus shaping thousand-grain weight and yield. Pericarp pigmentation is controlled by *Rc* and *Rd* together with the *Kala1–Kala3–Kala4* cassette; structural rearrangements in the *Kala4* promoter trigger ectopic expression of a bHLH factor and anthocyanin accumulation, whereas a 14-bp deletion in *Rc* converted most cultivars to the white-grained type and was later functionally restored via CRISPR/Cas9. Collectively, these findings provide a genetic foundation for targeted improvement of yield, harvestability and nutritional quality in modern rice breeding.

Keywords: rice; domestication; seed shattering; grain size; pericarp color; genes *SH4*, *qSH1*, *GW2*, *GS3*, *Rc*; anthocyanins; breeding.

ВВЕДЕНИЕ

Доместикация — самая ранняя форма селекции растений и одна из самых важных технологических инноваций в истории человечества. В процессе одомашнивания у культурных растений сформировался общий набор признаков, известный как «синдром доместикации». Основные признаки синдрома доместикации сельскохозяйственных культур можно свести к следующим шести характеристикам: 1) утрата или снижение способности к естественному

рассеиванию семян; 2) снижение способности к саморазмножению; 3) увеличение размера семян и плодов; 4) отсутствие периода покоя семян; 5) переход от многолетнего к однолетнему жизненному циклу; 6) компактный габитус [1].

Пять основных зерновых культур, таких как пшеница, рис, кукуруза, ячмень и сорго, были одними из первых растений, возделываемых в эпоху неолита, что способствовало становлению ранних сельскохозяйственных обществ. С тех пор они остаются основным источником калорий для большинства людей [2]. Богатые археологические и молекулярные данные позволили получить важные сведения об истории одомашнивания зерновых культур и проследить закономерности в приобретении ими признаков синдрома доместикации.

Рис — одна из важнейших культур в мире, более 90% мирового производства и потребления риса приходится на Азию [3]. Согласно археологическим исследованиям в средних и нижних течениях реки Янцзы, современный культивируемый рис (*Oryza sativa* L.) был одомашнен из дикого риса (*Oryza rufipogon* G.) около 10 000 лет назад [4]. В процессе одомашнивания произошли изменения формы и цвета семян, потеря периода покоя, увеличение числа семян, снижение осыпаемости и увеличение урожайности. У риса, как и у других зерновых культур, снижение осыпаемости семян — это одно из наиболее значительных изменений в процессе одомашнивания. Степень осыпания является не только одной из основных причин снижения урожайности риса, но и влияет на пригодность к современным механическим методам уборки [5]. Осыпание также становится препятствием для включения в селекционные программы диких видов, поскольку данный признак наследуется сцепленно с желаемыми хозяйственно ценными признаками [6].

Размер зерна является основным фактором, определяющим массу зерна, и одним из основных компонентов структуры урожая (количество метелок на растение, количество зерен на метелку и масса зерна). В селекции размер зерна обычно оценивается по массе зерна, которая положительно коррелирует с несколькими признаками, включая длину, ширину и толщину зерна [7]. Однако существует обратная корреляция с показателями качества урожая.

Доместикация белого риса вместо красного или черного обусловлена рядом факторов, связанных с агрономическими, пищевыми и культурными аспектами. Белый рис (особенно сорта *Oryza sativa* subsp. *japonica* Kato и *Oryza sativa* subsp. *indica* Kato) оказался более урожайным и приспособленным к различным климатическим условиям. Он легко адаптировался к различным технологиям возделывания на заливных полях и сухих террасах, что позволило ему распространиться на большие территории [8].

Белый рис легче очищать и обрабатывать. Удаление отрубей и шелухи делает его более усвояемым и универсальным для приготовления различных блюд. Полированный белый рис лучше хранится, что важно для создания продовольственных запасов и торговли [9]. Нейтральный вкус и мягкость сделали его предпочтительным в кулинарии многих народов [10].

Широкому распространению риса способствовали значительные изменения ряда признаков в ходе одомашнивания: изменение осыпания зерна, размер и окраска зерновок. Геномное секвенирование большого количества сортов и линий риса привело к глубокому изучению молекулярно-биологических основ этих изменений. В обзоре рассматриваются последние данные о генах, вовлеченных в контроль признаков риса, подвергшихся наиболее интенсивному одомашниванию.

ОСЫПАНИЕ СЕМЯН РИСА

Осыпание семян — важный механизм адаптации, выражающийся в способности к естественному опадению семян после их созревания и наблюдаемый у диких и сорных видов растений. Его эволюционное значение заключается в обеспечении эффективного рассеивания семян и формирования почвенного банка семян, что в будущем будет способствовать образованию устойчивых популяций, тем самым повышая приспособленность вида к условиям окружающей среды¹. Однако этот признак является нежелательным у одомашненных культур, в процессе доместикации которых предпринимались последовательные усилия по его минимизации с помощью традиционных и молекулярных методов селекции, так как осыпание семян может приводить к значительным потерям урожая в коммерческом сельском хозяйстве [5].

Неосыпаемость семян является одним из основных изменений и важным признаком перехода от дикого риса к культурному. Это также обеспечивает пригодность к современным методам механизированной уборки, значительно повышает урожайность и вносит существенный вклад в обеспечение продовольственной безопасности [5].

Осыпание семян риса — сложный хозяйственно-ценный признак, который регулируется физиологическими и генетическими механизмами в сочетании с факторами

¹ Kobe University. It takes three: The genetic mutations that made rice cultivation possible [Электронный ресурс] // ScienceDaily. 2022. URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/07/220705162231.htm> (дата обращения: 22.05.2024).

окружающей среды. К осыпанию семян у риса приводит развитие отдельного слоя между колоском и цветочной осью и его последующее разрушение. Основания колосков одомашненных видов характеризуются наличием ямочек и менее симметричными рубцами, в то время как у диких осыпающихся видов основания колосков имеют гладкий рубец с прямым профилем [11, 12]. Кроме того, у дикого риса отдельный слой формируется до цветения и начинает разрушаться во время цветения, в то время как у культурного риса он остается нетронутым и не проявляет признаков деградации даже после цветения [13].

Осыпание семян сильно зависит от взаимодействия генотипа и окружающей среды. Хотя признак контролируется генетически, на степень осыпания влияют и условия окружающей среды, в которых растение находится во время роста, в частности, температура, влажность воздуха и увлажненность. Показано, что высокая температура увеличивает осыпание семян у риса².

В настоящее время осыпание семян считается количественным признаком, который может контролироваться несколькими генами или несколькими основными и множеством второстепенных генов. До 2020 г. с использованием различных генетических популяций и карт сцепления на 12 хромосомах риса было обнаружено не менее 60 QTL/генов, связанных с осыпанием семян. Большинство QTL были идентифицированы путем скрещивания между двумя подвидами риса посевного *japonica* (*O. sativa* subsp. *japonica*) и *indica* (*O. sativa* subsp. *indica*), диким рисом (*O. rufipogon* G.) и сорным рисом (*Oryza* spp.). Очень немногие QTL были идентифицированы путем скрещивания между подвидами риса посевного *japonica* и *indica*, что отражает разнообразие генотипов, склонных к осыпанию семян, как внутри вида, так и между видами.

К настоящему времени клонировано 12 генов, связанных с осыпанием семян, среди которых *qSH1*, *SH4*, *Sh1/ObSH3*, *SHAT1*, *SH5*, *CPL1*, *SNB* и *ObSH11* являются основными генами, контролирующими образование отдельного слоя. *OSH15*, *GRF4/PT2*, *NPC1* и *LG1* — гены с плеiotропным действием, оказывающие значительное влияние на другие агрономические признаки. Большинство этих генов кодируют: транскрипционные факторы семейства MYB — *SH4* и *OgSH11*; транскрипционный фактор гомеобокс-типа BEL-1 — *qSH1*, KNOX белок *SH5*; транскрипционные факторы семейства AP2 — *SNB* и *SHAT1*; транскрипционный фактор YABBY — *Sh1/ObSH3*. Кроме того, некоторые из них кодируют киназы — *CPL1* и *NPC1* [5].

² Там же.

Мутации транскрипционного фактора MYB *SH4* приводят к неосыпающемуся фенотипу как у азиатского (*O. sativa*), так и у африканского (*Oryza glaberrima* Steud) культурного риса, которые были одомашнены из двух видов дикого риса *O. rufipogon* и *O. barthii* A. Chev соответственно. Мутация (G/T) в 237-м положении в первом экзоне аллели *SH4* в культурном азиатском рисе обуславливает замену аспарагиновой кислоты на серин, что приводит к неполному развитию отделительного слоя [12]. Исследователи локализовали и клонировали ген *SHA1* (Shattering 1), используя серию возвратных скрещиваний между культурным рисом сорта Teqing и интродукционной линией IL105 с осыпающимися семенами, происходящей от линии многолетнего дикого риса YJCWR. Аминокислотные последовательности белков *SHA1* и *SH4* на 98% совпадают, и мутация G/T также обнаружена в положении 237 в кодирующей последовательности. Однако гистологический анализ развития отделительного слоя у осыпающегося и неосыпающегося риса и анализ уровня накопления транскрипта в цветonoсе показали, что ген *SHA1* не участвует в формировании отделительного слоя, но связан с деградацией его клеток. По сравнению с геном *SH4*, последовательность гена *SHA1* имеет дополнительную вставку 6 п. н. в положении 158–163, что может приводить к различным функциям этих двух генов. Хотя ген-мишень *SH4* неизвестен, он может участвовать в программируемой гибели клеток или высвобождении гидролитических ферментов [14].

SNP (однонуклеотидный полиморфизм) в регуляторной 5'-области гена *qSH1*, который является ортологом гена *RPL* (REPLUMLESS) у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (контролирует развитие перегородки в стручке) [15], вызывает потерю осыпания семян из-за отсутствия формирования отделительного слоя. Этот SNP объясняет 68,6% разницы в осыпании между подвидами риса *indica* и *japonica* [16]. Другой ген типа BEL1-гомеобокс *SH5* имеет высокое сходство с геном *qSH1*. Чтобы выяснить его функциональную роль были созданы трансгенные растения с конструкцией для РНК-интерференции гена *SH5* на основе легко осыпающегося сорта Kasalath. Развитие отделительного слоя и потеря семян уменьшаются, когда экспрессия гена *SH5* подавляется. Кроме того, сверхэкспрессия гена *SH5* в умеренно осыпающемся сорте Dongjin и неосыпающемся сорте Prum приводит к увеличению осыпания семян, так как снижается уровень лигнина в базальной области колоса [17].

Сорт риса подвида *indica* GLA4 и линия дикого риса W1943 были использованы для создания интродукционной линии SL4, содержащей клонированные гены *SH4* и *qSH1*. С применением радиационного мутагенеза из линии SL4 были выделены и идентифицированы два мутанта с неосыпающимися семенами, *shat1* и *shat2*, даже когда гены *SH4* и *qSH1*

присутствовали вместе. Потеря осыпания у *shat1* контролируется геном *SHAT1* (shattering abortion1), который кодирует транскрипционный фактор AP2. У *shat2* неосыпаемость вызвана мутацией в известном гене осыпания *SH4*. Делеция 1 п. н. в первом экзоне между нуклеотидами +41 и +42 у мутанта *shat1* привела к сдвигу рамки считывания, что вызвало формирование фенотипа, не подверженного осыпанию [18]. Интродукционная линия дикого риса YIL100, характеризующаяся сильным осыпанием, использовалась для создания EMS мутантной библиотеки и отбора мутанта *ssh1* (suppression of shattering1) с уменьшенной степенью осыпания. В ходе картирования методом MutMap в сочетании с экспериментом по генетической трансформации был идентифицирован локус *GW2*. Анализ консервативного домена показал, что он гомологичен аллели *SSH1* гена *SNB* (supernumerary bract), кодирующего специфический для растений транскрипционный фактор AP2, который контролирует осыпание. Точечная мутация с заменой С на А в девятом интроне *SNB* изменяет сплайсинг его мРНК, вызывая уменьшение осыпания за счет изменения развития отделительного слоя. Введение мутантной аллели *ssh1* в сорт риса подвида *indica* 93-11 также увеличивает длину зерна на 9,5% и массу 1000 зерен на 7,7%, что указывает на то, что аллель *ssh1* может улучшить урожайность риса [19].

Ген *OsSh1* (Shattering 1) кодирует транскрипционный фактор YABBY и является гомологом гена *sh1*, который контролирует осыпание семян у сорго. Используя мутантную линию неосыпающегося риса (SR-5) и селекционную линию дикого риса (Nanjing 11), был проведен геномный сравнительный анализ и анализ экспрессии на уровне транскрипции, и идентифицирована вставка фрагмента больше 4 т. п. н. в третьем интроне гена *OsSh1*, что привело к снижению уровня его транскрипции и фенотипу, устойчивому к осыпанию [20]. Ген *ObSH3* (*O. barthii* seed shattering 3), выявленный у дикого африканского риса, расположен на хромосоме 3 и кодирует транскрипционный фактор YABBY. Делеция сегмента генома, содержащего ген *ObSH3* в африканском культурном рисе, приводит к асимметричному и неполному развитию отделительного слоя и, как следствие, к потере осыпания [21].

Исследователи охарактеризовали линию риса Hsh, которая происходит от неосыпающегося сорта подвида *japonica* Hwacheong. Было выявлено, что осыпание Hsh контролируется рецессивной аллелью *sh-h*, которая кодирует белок, содержащий консервативный домен фосфатазы (carboxy-terminal domain, CTD), под названием *OsCPL1* (*O. sativa* CTD phosphatase-like 1). *OsCPL1* подавляет дифференциацию отделительного слоя во время развития метелки [6].

Показано, что ген *NPC1* (non-specific phospholipase C1) модулирует распределение кремния и отложение вторичной клеточной стенки в узлах и зернах, влияя на механическую прочность и осыпание семян. Линии со сверхэкспрессией гена *NPC1* имеют хрупкие стебли и узлы метелок, которые легко ломаются при сгибании, что приводит к легкому осыпанию зрелых семян [22].

Ген *OSH15* (*O. sativa* homeobox 15) кодирует белок с гомеодоменом типа knotted. Предыдущие исследования показали, что *OSH15* экспрессируется в области, где позже развивается апикальная меристема побега на ранних стадиях эмбриогенеза, также мРНК гена *OSH15* обнаруживаются в отделительном слое во время развития колосков. Кроме того, гены *OSH15* и *SH5* взаимодействуют напрямую с геном фенилпропаноидного пути биосинтеза *CAD2* (cinnamyl alcohol dehydrogenase 2), ингибируя содержание лигнина, что приводит к снижению осыпания семян [23].

Ген *GRF4* (growth-regulating factor 4) кодирует транскрипционный фактор, регулирующий высоту растения, который положительно влияет на форму зерна и длину метелки и отрицательно — на осыпание семян. Более высокая экспрессия гена *GRF4* коррелирует с более крупным зерном, более длинной метелкой и меньшим осыпанием семян. Экспрессия негативно регулируется миРНК (ген *OsmiRNA396*), которая связывается с мРНК гена *GRF4*. Доминантная мутация *GRF4* в сайте связывания с миРНК396 приводит к более высокой экспрессии гена и соответствующим фенотипическим различиям. Кроме того, ген *OsGRF4* негативно регулирует экспрессию генов цитокининдегидрогеназ *CKX5* и *CKX1*, участвующих в разрушении цитокининов, что приводит к повышению их уровня у мутанта *GRF4* и может влиять на признаки метелки [9].

Локус *SPR3* (*Spreading Panicle 3*) идентифицирован как геномная область размером 9,3 т. п. н., и результаты тестов по комплементации позволяют предполагать, что эта область регулирует экспрессию гена *OsLG1* (*O. sativa* liguleless gene 1), который контролирует развитие лигулы и ушков листа. Мутация в локусе *SPR3* у *O. rufipogon* изменяет структуру метелки с открытой на закрытую, что приводит к снижению осыпаемости семян [24]. Продemonстрировано также, что у африканского культурного риса *O. glaberrima* происходит значительное снижение осыпания семян при нокауте гена *SH11*, так как *OgSH11* подавляет экспрессию генов биосинтеза лигнина и отложение лигнина, связываясь с промотором гена *GH2* (gold hull and internode2)/*CAD2*. Однако этот ген, называемый *JAMyb/MYb21* у *O. sativa*,

связан с реакцией на биотические и абиотические стрессы, и ранее не было сообщений об исследованиях, связанных с осыпанием семян риса [9].

РАЗМЕР ЗЕРНА РИСА

Размер и качество зерна — неразрывно связанные важные агрономические признаки большинства зерновых культур. Размер зерен или плодов — важный признак, который стал объектом многочисленных исследований, направленных на изучение лежащих в его основе консервативных регуляторных механизмов. В отличие от других зерновых, в том числе кукурузы и пшеницы, где искусственный отбор связан с почти равномерным увеличением размера семян и зерен, одомашненный рис характеризуется значительным фенотипическим разнообразием размеров и формы зерен [25, 26].

Одним из ключевых элементов урожайности риса является масса тысячи зерен. Размер зерна — сложный количественный признак, включающий в себя длину, ширину, толщину и соотношение длины и ширины зерна, — является одним из определяющих факторов массы зерна, который влияет не только на урожайность, но и на внешний вид риса. Понимание генетической и молекулярной основы размера зерна чрезвычайно важно для селекции риса [27,28].

В последнее десятилетие было выявлено множество QTL, связанных с размером зерна риса. В большинстве случаев молекулярная характеристика генов, влияющих на размер зерна (таких как *GS3*, *GW2* и *TGW6*), показывает, что многие из них являются негативными регуляторами размера зерна, так что аллели дикого типа связаны с мелким зерном, в то время как мутации — с крупным [29]. При этом некоторые изученные локусы не участвовали в процессе доместикации, но на фоне современных селекционных достижений могут внести свой вклад в улучшение сортов [8].

Так, был изучен локус *GW2*. Исследователи подобрали сорта, значительно отличавшиеся по изучаемому признаку — размеру зерна. Был скрещен японский сорт WY3 с очень крупным зерном (масса 1000 зерен $41,9 \pm 1,3$ г) и высококачественный элитный сорт подвида *indica* Fengaizhan-1 (FAZ1) с мелким зерном (масса 1000 зерен $17,9 \pm 0,7$ г) для получения популяции F2. На основе этой популяции на хромосоме 2 был картирован крупный QTL, контролирующий ширину зерновки — *GW2*, причем аллель WY3 в локусе *GW2* способствовала увеличению ширины зерновки [30].

В аллели *FAZ1* локуса *GW2* исследователи выявили 8 экзонов и 7 интронов, он кодирует полипептид длиной 425 аминокислотных остатков. Сравнение нуклеотидных последовательностей аллелей *FAZ1* и *WY3* в локусе *GW2* выявило три нуклеотидных изменения, включая две нуклеотидные замены в экзонах 1 и 8, которые не привели к каким-либо аминокислотным изменениям, и делецию 1 п. н., приведшую к образованию преждевременного стоп-кодона в экзоне 4 аллели *WY3*. Преждевременный стоп-кодон вызвал укорочение белка на 310 аминокислотных остатков [30].

Анализ консервативного домена показал, что локус *GW2* гомологичен последовательности белка RING-типа. В ряде исследований было показано, что *in vitro* белки RING-типа функционируют как E3-убиквитин-лигазы, помечая белки для последующей деградации [31]. Кроме того, вариант *WY3* локуса *GW2* имеет интактный RING-домен, тем самым сохраняя E3-убиквитин-лигазную активность, но усечен на 310 аминокислотных остатков, которые могут содержать субстрат-связывающий домен, то есть не взаимодействует с субстратом(ами), участвующим(и) в делении клеток, и не направляет их на убиквитинирование и последующую деградацию. Отсутствие субстрат-связывающего домена позволяет предположить, что *WY3 GW2* является нулевой аллелью [30].

Чтобы изучить влияние *GW2* на зерно риса, исследователи вывели почти изогенную линию NIL (near isogenic line) *GW2* на генетическом фоне *FAZ1*, содержащую очень небольшой участок локуса *GW2* из сорта *WY3*. Наблюдалось значительное увеличение ширины зерна (+26,2%) и увеличение (+49,8%) массы 1000 зерен у изогенной линии NIL(*GW2*). Из этого можно сделать вывод, что увеличение массы зерна у линии NIL(*GW2*) было обусловлено в первую очередь увеличением ширины зерна. Было обнаружено, что урожайность зерна с одного растения у NIL(*GW2*) также увеличилась (+19,7%), хотя количество зерен на основной метелке было меньше [30].

Учитывая, что колосок у линии NIL(*GW2*) был шире, чем у сорта *FAZ1*, сравнили поперечные срезы центральной части колоса у этих форм, чтобы выяснить происхождение наблюдаемых различий в размерах. Наружный слой клеток паренхимы у линии NIL(*GW2*) был длиннее (на 29,6%) и содержал значительно больше клеток (на 22,4%), чем у сорта *FAZ1*, при этом длина клеток увеличилась всего на 5,8%. Эти данные свидетельствуют, что увеличение ширины зерна происходит за счёт увеличения количества клеток, а не за счет их растяжения [30].

При исследовании локуса *GS3* были подобраны две родительских линии — Minghui 63 и Chuan 7, значительно различающиеся по изучаемым признакам массы зерна и его длины. Аллель локуса *GS3* линии Minghui 63 способствовала увеличению массы, длины и толщины зерна, но уменьшению его ширины. Соответственно, аллель линии Chuan 7 имела обратный эффект — уменьшала массу зерна, его длину и толщину [32].

На основе данных, полученных при изучении изогенных линий, QTL *GS3* был картирован на хромосоме 3 в области между индель-маркером *GS09* и SSR-маркером *MRG5881*, его длина составила 7,9 т. п. н. Ген *GS3* имеет пять экзонов с длиной транскрипта 956 п. н., кодирует 232 аминокислотных остатка [32].

Анализ предсказанной последовательности белка *GS3* выявил несколько известных областей и доменов. Предположительно, он состоит из РЕВР-подобного домена, трансмембранной области, цистеин-богатого домена семейства *TNFR/NGFR* и домена *VWFC*. Интересно, что домен *VWFC* также обнаружен в белке гена, контролирующего форму плода у томата и у других видов растений, из чего можно сделать вывод, что домен *VWFC* может играть роль в регуляции формы плода/зерна путем негативного влияния на рост [33]. Предполагается, что общая функция домена *VWFC* заключается в регулировании роста путем разрушения сайтов связывания рецепторов суперсемейства *TGF-beta* во внеклеточном матриксе [34].

Для выявления мутации, вызвавшей вариации длины зерна, был проведен анализ последовательности гомологичного фрагмента ДНК в области 7,9 т. п. н. Была обнаружена однонуклеотидная мутация во втором экзоне гена *GS3*, которая изменила цистеиновый кодон (TGC) в мелкозерновом генотипе на терминирующий кодон (TGA) в генотипе с крупным зерном. Эта преждевременная терминация — причина усечения С-конца белка в группе с длинным зерном на 178 аминокислот, что привело к удалению части РЕВР-подобного домена и всех трех других консервативных доменов. Такая мутация четко согласуется с рецессивным характером наследования длинного зерна, указывая на то, что длинное зерно возникло в результате потери функции белка [32].

Используя популяцию удвоенных гаплоидов, полученную от скрещивания линий Zhenshan 97 и H94 подвида *O. sativa ssp. indica*, был обнаружен QTL *GS5* (область размером 11,6 т. п. н.) в интервале между двумя молекулярными маркерами *RM574* и *S2* на коротком плече хромосомы 5, причем аллель из линии Zhenshan 97 способствовала повышению урожайности [29]. При исследовании влияния гена *GS5* на размер и наполняемость зерна

выяснилось, что увеличение массы зерна и урожайности с одного растения произошло в результате увеличения как ширины зерна, так и скорости его наполнения [29].

Ген *GS5* состоит из десяти экзонов, кодирующих сериновую карбоксипептидазу, принадлежащую к семейству пептидаз S10. Было проведено сравнение геномных последовательностей, соответствующих кодирующим и промоторным областям *GS5*, между сортами с узким и широким зерном [35]. Две узкозерных линии (H94 и Minghui 63) имели идентичные последовательности, которые сильно отличались от последовательностей широкозерной линии Zhenshan 97. Кодирующие последовательности гена *GS5* у линий H94 и Minghui 63 имеют длину 1440 п. н. и кодируют полипептид из 480 аминокислот, в то время как кодирующая последовательность у линии Zhenshan 97 состоит из 1446 п. н. и кодирует полипептид из 482 аминокислот. Шесть оснований встроены на 10–15 п. н. ниже сайта начала трансляции в Zhenshan 97, по сравнению с H94 и Minghui 63, что привело к увеличению белка на 2 аминокислоты в районе предсказанного сигнального пептида. Кроме того, между двумя группами линий имелось четыре нуклеотидных различия в последовательностях, которые привели к заменам трех аминокислот. Сравнение промоторных последовательностей выявило 18 нуклеотидных вариантов (замен, делеций и инсерций) в пределах 2 т. п. н. к 5' от сайта начала трансляции, различающих одну группу от другой [35].

Для изучения механизмов, лежащих в основе различий между узко- и широкозерными линиями, J.M. O'Leary и соавт. [37] провели секвенирование области, содержащей ген *GS5*, а также генетическую трансформацию конструкциями с промотором вируса мозаики цветной капусты 35S и промоторной области гена *GS5* длиной 2 т. п. н. из линии Zhenshan 97, слитыми с кДНК гена *GS5* линии H94 (узкое зерно). Из результатов экспериментов исследователи сделали вывод, что влияние гена *GS5* на размер зерна обусловлено вариациями в промоторной области, а не в кодирующей. Анализ расщепления в потомстве вышеупомянутых генетически трансформированных линий показал, что ширина зерна значительно ($p < 0,01$) коррелирует с уровнем экспрессии гена *GS5*: растения с более высоким уровнем экспрессии дают более широкие зерна [35].

Эти результаты позволяют предположить, что ген *GS5* положительно регулирует размер зерна, увеличивая число клеток и, в некоторой степени, их размер, что приводит к усилению роста зерна в ширину. Деление клеток в эукариотических организмах контролируется высококонсервативным основным механизмом клеточного цикла. Чтобы изучить связь *GS5* с генами, регулирующими клеточный цикл растений, провели поиск в базе

данных Rice Genome Browser. В результате поиска было выявлено 25 генов, в том числе 14, предположительно участвующих в фазах G1/S, и 11 — в фазе G2/M. Была проанализирована экспрессия этих 25 генов в растениях, несущих мутацию *gs5*, и в растениях, сверхэкспрессирующих *GS5*, по сравнению с диким типом. Уровни транскриптов пяти предполагаемых генов, контролирующих G1/S-фазы, — *CDKA1*, *CAK1*, *CAK1A*, *CYCT1* и *H1* — были значительно повышены в растениях, сверхэкспрессирующих *GS5*, по сравнению с растениями, не несущими трансген. Напротив, экспрессия этих пяти генов была значительно снижена у мутанта *gs5* по сравнению с диким типом [32,36-40]. Таким образом, *GS5* функционирует, предположительно, как положительный модулятор генов клеточного цикла, и его сверхэкспрессия может приводить к увеличению числа клеток за счет стимулирования митотического деления [29].

Ген *TGW6* (THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6), вероятно, не имел приоритета для отбора при одомашнивании, однако у современных сортов *TGW6* может повышать урожайность, поскольку оказывает плеiotропное влияние на продуктивность и размер запасующих органов [41-43].

К. Ishimaru и соавт. [30] картировали локус *TGW6* из бекроссированных инбредных линий (NIL), полученных от японского высокоурожайного сорта Nipponbare и индийского местного сорта Kasalath на участке 4,9 т. п. н. между маркерами G214 и G232 на хромосоме 6. Аллель *TGW6* у сорта Kasalath, в отличие от Nipponbare, содержала 6 нуклеотидных замен и делецию 1 п. н. в положении 313. Эта делеция вызвала сдвиг рамки считывания и остановила образование полноценного белка из-за появления преждевременного стоп-кодона, тогда как 6 нуклеотидных замен не имели никакого влияния на биосинтез белка. Таким образом, сдвиг рамки считывания мог привести к формированию нефункционального белка *TGW6* у сорта Nipponbare.

В тесте на комплементацию растения Nipponbare и NIL(*TGW6*) были трансформированы генетической конструкцией для РНК-интерференции (RNAi) изучаемого локуса. У трансформантов Nipponbare длина зерна и масса тысячи зерен была значительно выше, чем в контроле. При этом экспрессия *tgw6* была ниже, чем в контроле, а относительный уровень экспрессии отрицательно коррелировал с длиной зерна. У NIL(*TGW6*), напротив, ведение конструкции RNAi не повлияло на длину зерна у трансформантов. Из этого следует, что делеция 313-й нуклеотида является функциональным нуклеотидным полиморфизмом (FNP) для *TGW6* [30].

С помощью ПЦР-РВ было показано, что ген *TGW6* экспрессируется в зернах риса и запасующих органах, в частности, особенно высок уровень экспрессии в метелках. При этом транскрипты *TGW6* накапливались вокруг эндосперма в перикарпии [30]. При сравнении продольных срезов зрелых зерен Nipponbare и NIL(*TGW6*) количество клеток эндосперма у NIL(*TGW6*) было значительно больше (на 24%), чем у Nipponbare, в то время как длина клеток эндосперма была одинаковой [30].

Исследователи на основании структуры белка *TGW6* сравнили последовательности и трехмерные структуры белков *TGW6* из Nipponbare, стриксозидинсинтазы (*STR1*) и диизопропилфторфосфатазы (*DFPase*) [31,38]. Было продемонстрировано их значительное сходство между собой, что позволяет предположить гидролизующую активность белка *TGW6*. Так, при помощи молекулярного докинга было показано, что конъюгаты индол-3-уксусной кислоты (ИУК), в частности ИУК-глюкоза, могут быть субстратом для *TGW6* [30]. Таким образом, белок *TGW6* из сорта Nipponbare, видимо, гидролизует ИУК-глюкозу с образованием ИУК и глюкозы, а *TGW6* сорта Kasalath — нет.

В целом, аллель *tgw6* сорта Nipponbare, по-видимому, влияет на время перехода от синцитиальной к клеточной фазе, контролируя поступление гормонов, и, следовательно, ограничивает число клеток и длину зерна. Поэтому потеря функции в аллеле сорта Kasalath оказала желательное влияние на размер зерна [45,47].

ОКРАСКА ЗЕРНА РИСА

Накопление антоцианов у риса — признак, связанный с одомашниванием, который может использоваться для отслеживания эволюционной истории риса [47]. Цвет зерна злаков определяется пигментацией определенных фитохимических веществ. У риса (*O. sativa*) большинство сортов имеют белые зерна, но у некоторых сортов — коричневые, красные или черные. Красный цвет зерен обусловлен отложением и окислительной полимеризацией проантоцианидинов в перикарпии, в то время как черный цвет зерен обусловлен накоплением антоцианов [48].

Антоцианы — водорастворимые вторичные метаболиты. Наиболее часто встречающимися агликонами у растений являются цианидин, пеонидин, пеларгонидин и дельфинидин. Биосинтез антоцианов начинается с соединений малонил-КоА и п-кумароил-КоА. Халконсинтаза (*CHS*) катализирует синтез тетрагидроксиалкона из п-кумароил-КоА и трех молекул малонил-КоА. Тетрагидроксиалкон превращается в нарингинин под действием

халконизомеразы (CHI), а затем в дигидрокемпферол (DHK) с помощью флаванон-3-гидроксилазы (F3H). Из DHK может образовываться дигидрокверцетин (DHQ) с помощью флавоноид-3'-гидроксилазы (F3'H) и дигидромирицетин (DHM) за счет флавоноид-3',5'-гидроксилазы (F3'5'H) [44].

Дигидрофлавонолы (DHK, DHQ, DHM) превращаются в антоцианы в три этапа: восстановление дигидрофлавонолов дигидрофлавонолредуктазой (DFR) до лейкоантоцианидинов, далее происходит окисление лейкоантоцианидинов до антоцианидинов лейкоантоцианидиноксидазой (LDOX), после чего происходит гликозилирование антоцианидинов 3-глюкозилтрансферазой (3GT) с образованием антоцианидин-3-О-глюкозидов (антоцианов).

Антоцианидин-3-О-глюкозиды могут подвергаться дальнейшим модификациям (гликозилирование, метилирование, ацетилирование), образуя различные декорированные антоцианы. В окрашенном рисе наиболее распространен цианидин-3-О-глюкозид, а красный цвет семян обусловлен проантоцианидинами — полимеризованными катехинами и эпикатехинами, синтез которых начинается с восстановления лейкоантоцианидинов цианидина лейкоантоцианидинредуктазой (LAR) или антоцианидинов антоцианидинредуктазой (ANR) [49,50]. Антоцианы и проантоцианидины играют важную роль не только в пигментации семян, но и в защите растений от различных биотических и абиотических стрессов. Эти соединения имеют сильные антиоксидантные свойства, что делает их полезными для здоровья человека [51].

Окраска риса контролируется двумя ключевыми механизмами: структурными генами и регуляторными факторами транскрипции (TF).

Структурные гены кодируют ферменты, необходимые для синтеза антоцианов. Важным примером является ген, кодирующий фермент DFR, который участвует в преобразовании дигидрофлавонолов в лейкоантоцианидины, критический этап в пути биосинтеза антоцианов [52].

У риса известны гены/локусы *Rd*, *Rc* и *A*, которые играют ключевую роль в синтезе проантоцианидинов и ответственны за пигментацию перикарпия риса. Генетический анализ с использованием SSR- и QTL-маркеров показал, что ген *Rd* расположен на хромосоме 1 риса между маркерами R2374 и C808, а локус *A* — на расстоянии 0,3 сМ от него. Вероятно, локусы *Rd* и *A* идентичны, и оба кодируют дигидрофлавонол-4-редуктазу (DFR). Введение функциональной копии гена *DFR* в коричневозерную линию риса с генотипом *Rcrd* привело к

получению растений риса с красным зерном за счет накопления проантоцианидинов, что подтверждает, что локус *Rd* кодирует белок DFR. Анализ белков у трансформированных линий риса, проведенный методом вестерн-блотинга, показал наличие трех белков с массами 46, 32 и 22 кДа, которые взаимодействуют с анти-DFR-антителами. Это свидетельствует о возможной инициации трансляции мРНК гена *DFR* с разных стар-кодона, что приводит к образованию нескольких белков. Белки с массами 32 и 22 кДа были также выявлены в семенах линий с генотипом *rcrd*, несмотря на наличие стоп-кодона в их последовательностях, что указывает на использование альтернативных стар-кодона трансляции [53].

Работу структурных генов синтеза регулируют комплексы, состоящие из основных транскрипционных факторов типа R2R3-MYB, bHLH и WD40. Эти факторы работают совместно, чтобы активировать или подавлять синтез антоцианов в ответ на различные стимулы [54]. Один из таких TF кодирует ген *Rc*.

Для изучения природы гена *Rc*, контролирующего красную окраску перикарпия риса, была проведена серия экспериментов. Построение генетической карты на основе морфологических и молекулярных маркеров позволило сделать вывод, что накопление красной окраски зерна контролируется аллелями гена, расположенного в хромосоме 7. Эти карты сцепления стали основой для дальнейших исследований и более точного определения генов, ответственных за окраску перикарпия [55].

Красный цвет зерна широко распространен среди диких предков *O. sativa*, у которых он тесно связан с осыпаемостью семян и состоянием покоя [56,57], о чем говорит тесное сцепление локуса *qSD7-1*, ответственного за покой семян, с геном *Rc*, контролирующим красную окраску перикарпия, на хромосоме 7 [58,59]. Помимо сцепления гены окраски зерна у риса могут иметь плейотропный эффект, так, например, ген *Rc* влияет не только на окраску перикарпия, но и на период покоя семян, за счет своего воздействия на биосинтез абсцизовой кислоты (ABA) и флавоноидов [60].

Для поиска изменений в последовательности, которые могли бы объяснить наблюдаемое изменение цвета перикарпия, было проведено секвенирование аллелей гена *Rc* родительских форм сорта Jefferson *O. sativa* и линии *O. rufipogon*, использованных для картирования. В геномной последовательности были обнаружены 6 инделов и 22 однонуклеотидных различия. Секвенированные последовательности также сравнили с общедоступной последовательностью ДНК сорта Nipponbare (сорт риса подвида *japonica* с белой окраской перикарпия). Аллель сорта Jefferson была идентична последовательности

Nipponbare. Учитывая возможность того, что аннотация последовательности Nipponbare может привести к созданию генной модели, отличающейся от доминантной аллели, была проведена аннотация аллели, полученной от *O. rufipogon*. В аннотации Nipponbare были укорочены 3'-конец пятого экзона и 5'-конец шестого экзона по сравнению с генной моделью для *O. rufipogon*. Это привело к предсказанию более короткой мРНК у Nipponbare, которая оказалась на 513 п. н. короче, чем мРНК *O. rufipogon*. При сравнении сорта Jefferson и *O. rufipogon* с учетом этой новой модели гена было выявлено 10 различий в пределах кодирующей последовательности. Пять из них могли повлиять на аминокислотную последовательность белка. Чтобы определить, какое из этих различий в родительских последовательностях может отвечать за измененную функцию гена, был отсекарован ген *Rc* (кодирующий транскрипционный фактор с мотивом bHLH) у линии H75 подвида *japonica*, характеризующегося окрашенным перикарпием и мутантной аллелью *Rc*.

Результаты показали, что линия H75, так же как и *O. rufipogon*, несет функциональный аллель *Rc*, однако генетически он ближе к сорту Jefferson, чем к *O. rufipogon*. Поэтому сравнение последовательностей гена *Rc* между линией H75 и сортом Jefferson позволило бы исключить вариации на нуклеотидном уровне между родителями. В результате этого сравнения было выявлено, что кодирующая последовательность аллели *Rc* у линии H75 идентична последовательности сорта Jefferson за исключением 14-нуклеотидного инделя в экзоне 6. Эта 14-нуклеотидная вставка присутствовала как у H75, так и у *O. rufipogon*, но отсутствовала у сортов Jefferson и Nipponbare. Делеция вызывает сдвиг рамки считывания, что приводит к появлению двух преждевременных стоп-кодонов перед концом экзона 6, вызывая образование укороченного белка перед доменом bHLH. Учитывая, что эта делеция 14 п. н. была единственным отличием между аллелями в линии H75 и сортах Jefferson и Nipponbare, а ее расположение в экзоне 6 согласуется с данными рекомбинации, можно заключить, что она является единственной очевидной причиной отсутствия пигмента в перикарпии зерна сортов Jefferson и Nipponbare [56].

Таким образом, *Rc* — ген, непосредственно связанный с domestikацией риса, необходим для формирования красного перикарпия у риса (*O. sativa*). *Rc* кодирует транскрипционный фактор с доменом basic helix-loop-helix (bHLH), картированный на хромосоме 7. Кроме того, этот транскрипционный фактор может связываться с промоторными регионами генов, участвующих в биосинтезе ABA, таких как NCED (9-цис-

эпоксикаротиноиддиоксигеназы). Это связывание активирует транскрипцию этих генов, что приводит к увеличению синтеза АВА [61].

Данные описанных выше исследований позволили отечественным ученым создать тест-систему для определения примеси красного риса в промышленных посевах. Был разработан кодоминантный маркер, позволяющий, начиная с ранних стадий развития растения, выявлять его генотип в отношении аллелей гена *Rc*. Созданная в данной работе маркерная система может работать при использовании как обеих пар праймеров, так и при использовании каждой пары в отдельности. Опыты со смешиванием ДНК краснозерных и белозерных форм риса в различных пропорциях показали, что разработанная методика выявления краснозерных форм в посевах риса до образования метелок способна обнаружить одно краснозерное растение, несущее доминантную аллель гена краснозерности *Rc*, среди двухсот белозерных, что соответствует краснозерной примеси равной 0,5 %. У сорта Wells также была выявлена точечная мутация (SNP) в гене *Rc*, которая восстановила рамку считывания, превращая аллель *rc*, обычно дающую белый перикарпий, в доминантную аллель *Rc-g*. Эта мутация позволила синтезировать нормальный фермент, что привело к красной окраске семян, характерной для дикого типа риса [62]. Тест-система для детекции этой мутации была адаптирована для использования ПЦР-РВ: подобраны оптимальные условия и проведена оценка чувствительности метода с использованием двух зондов в одной реакционной смеси ПЦР. Показано, что в подобранных условиях ПЦР можно определить признак красного или белого перикарпия у отдельных растений на стадии проростков. Система также позволяет детектировать наличие 10% примеси краснозерного риса [63].

Исследования, связанные с этим признаком, идут в настоящее время, и используются все новые методы и технологии изучения. Так, был разработан новый метод, основанный на технологии редактирования CRISPR/Cas9, который позволяет функционально восстанавливать рецессивную аллель *rc*. Была исправлена делеция 14 п. н., вызывающая сдвиг рамки считывания, путем замены ее на делеции, кратные трем, что позволяет сохранить рамку считывания. Этот подход успешно преобразовал три элитных сорта белого риса в краснозерные. В зерне риса из отредактированных линий T1 — *Rc* было проанализировано содержание проантоцианидинов и антоцианидинов, высокие уровни накопления которых были обнаружены в краснозерных линиях. Более того, между исходными краснозерными сортами и отредактированными не было обнаружено значительных различий в основных агрономических характеристиках, что указывает на то, что восстановление функции *Rc* не

оказало отрицательного влияния на важные агрономические характеристики риса. Учитывая, что у большинства белых сортов риса белый перикарпий обусловлен 14-нуклеотидной делецией в гене *Rc*, можно предположить, что этот метод можно применить к большинству белых сортов риса, что значительно ускорит разведение новых сортов красного риса с хозяйственно-ценными признаками [64].

Исследование генов *Rc* и *Rd* открывает новые возможности для генетического улучшения сортов риса, направленных на повышение их пищевой ценности и устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Черная окраска зерна риса, связанная с накоплением антоцианов в перикарпии, не является типичным признаком для большинства культивируемых сортов риса, что свидетельствует об ее уникальности и потенциальном эволюционном значении [65].

Для выявления генов, ответственных за черную окраску перикарпия, исследователи использовали методы классического генетического анализа. Растения сорта Koshihikari с белыми зернами и сорта HongXieNuo с черными зернами были скрещены между собой для создания поколения F1, от которых путем возвратных скрещиваний с растениями сорта Koshihikari была получена изогенная линия с черным зерном. Для определения участков генома, ассоциированных с черной окраской зерен, был проведен полногеномный анализ с использованием маркеров SSR, сцепленных со всеми 12 хромосомами риса. Это позволило идентифицировать хромосомные регионы, связанные с черной окраской перикарпия. В результате картирования были выявлены три ключевых региона на хромосомах 1, 3 и 4, которые влияли на черную окраску перикарпия. Эти регионы были названы локусами *Kala1*, *Kala3* и *Kala4* (от *Key gene for black coloration by anthocyanin accumulation on chromosome 1, 3, 4*) [60].

Для подтверждения роли выявленных локусов в черной окраске перикарпия и уточнения их расположения был создан гибрид F2 путем скрещивания изогенной линии черnozерного риса с растениями сорта Koshihikari. В F2-популяции было проанализировано 542 растения, что позволило провести более точное картирование.

Растения популяции F2 были разделены на группы по цвету зерен: черные, коричневые и белые. Это позволило определить наследование признака черной окраски. Анализ показал, что только растения гомозиготные по аллелям HongXieNuo всех трех локусов имели черные зерна. В результате этого анализа локус *Kala3* был детально картирован, и его локализация была уточнена до района в 516 т. п. н. на хромосоме 3. Используя SSR-маркеры для

генотипирования растений F2 также от скрещивания сортов Koshihikari и HongXieNuo, были идентифицированы два маркера — RM3092 и RM2441 — между которыми находился целевой ген *Kala4* на хромосоме 4. Более точное картирование провели с использованием трех тысяч растений поколения F2, которые затем генотипировали с использованием двух ПЦР-маркеров (200a/800a и 800bc), расположенных вблизи предполагаемой области расположения гена. После предварительного генотипирования были отобраны 30 растений-рекомбинантов для дальнейшего генотипирования. Для этого использовали семь дополнительных маркеров, расположенных в области гена *Os04g0557500*. Эти маркеры позволили сузить зону поиска до участка размером 25,6 т. п. н. [48].

Между маркерами RM3092 и RM2441 были выявлены три гена, кодирующие bHLH-транскрипционные факторы. Эти гены стали основными кандидатами на роль целевого гена. Для изучения структурных особенностей гена *Os04g0557500* были использованы методы секвенирования и гель-блот анализа. Анализ ДНК показал наличие структурных изменений в области промотора у черных сортов риса. Эти изменения включали вставку 11,0 т. п. н. и частичное дублирование этой вставки. Эти структурные перестройки привели к активации гена *Kala4*, что в свою очередь вызвало накопление антоцианов и черный цвет перикарпия. Это доказывает, что черный цвет зерен обусловлен эктопической экспрессией гена bHLH-транскрипционного фактора *Kala4*, вызванной структурными изменениями в его промоторной области [48].

В пределах каждого из локусов, в которых картировали гены *Kala1*, *Kala3* и *Kala4*, были выявлены гены, потенциально ответственные за черную пигментацию. Ген *Kala1* соответствует известному структурному гену *DFR*, который участвует в синтезе антоцианинов. *Kala4* соответствует гену, кодирующему белок bHLH, который также вовлечен в контроль синтеза антоцианинов. *Kala3* — регуляторный MYB-ген, который регулирует тканеспецифичную окраску. Анализ генотипов и фенотипов показал, что аллели черnozерного сорта HongXieNuo в локусах *Kala1* и *Kala3* играют второстепенную роль в окраске риса. Об этом свидетельствует коричневый цвет зерен изогенной линии, которая имеет аллели Koshihikari в локусах *Kala1* и *Kala3* и аллель HongXieNuo в локусе *Kala4*. Было определено, что основную роль в наследовании черной окраски играет локус *Kala4*. Это подтверждается тем, что зерна изогенной линии с аллелями HongXieNuo в локусах *Kala1* и *Kala3* и аллелью Koshihikari в локусе *Kala4* полностью белые. Черную окраску имеют только растения, содержащие аллели HongXieNuo всех трех генов в гомозиготном состоянии [60].

Признак черной окраски зерна риса, скорее всего, является новоприобретенным, появившимся либо во время, либо после одомашнивания риса. По сравнению с широким распространением сортов белого риса, сорта черного риса единично распространены по всей Азии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюционная история риса сложна, но большое количество исследований детально описывает генетику перехода от дикого (*O. rufipogon* и *O. nivara*) к одомашненному (*O. sativa*) рису. Типы задействованных генов, а также молекулярные механизмы их работы (табл. 1) позволят лучше понять пути доместикации и в дальнейшем вывести улучшенные сорта риса [9].

Таблица 1. Гены, контролирующие осыпаемость, размер зерна и окраску перикарпия у риса

Ген	Локус	Предполагаемая функция	Литературный источник
Осыпаемость			
<i>SH4</i>	Хромосома 4	Кодирует транскрипционный фактор MYB	[12]
<i>SHA1</i>	Хромосома 4	Кодирует транскрипционный фактор семейства Trihelix	[14]
<i>qSH1</i>	Хромосома 1	Кодирует транскрипционный фактор гомеобокс-типа BEL-1	[16]
<i>SH5</i>	Хромосома 5	Кодирует транскрипционный фактор гомеобокс-типа BEL-1	[16]
<i>SHAT1</i>	Хромосома 4	Кодирует транскрипционный фактор AP2	[17]
<i>SNB</i>	Хромосома 7	Кодирует транскрипционный фактор AP2	[18]
<i>OsSh1</i>	Хромосома 1	Кодирует транскрипционный фактор YABBY	[19]
<i>ObSH3</i>	Хромосома 3	Кодирует транскрипционный фактор YABBY	[20]
<i>OsCPL1</i>	Хромосома 7	Кодирует белок, содержащий консервативный домен фосфатазы (carboxy-terminal domain, CTD)	[6]
<i>NPC1</i>	Хромосома 3	Кодирует неспецифическую фосфолипазу C1	[22]
<i>OSH15</i>	Хромосома 7	Кодирует белок с гомеодоменом типа knotted	[23]

<i>GRF4</i>	Хромосома 2	Кодирует транскрипционный фактор, регулирующий рост, который положительно влияет на форму зерна и длину метелки и отрицательно влияет на осыпание семян	[9]
<i>OsLG1</i>	Хромосома 4	Контролирует развитие лигулы и ушков листа	[24]
<i>OgSH11</i>	Хромосома 11	Кодирует транскрипционный фактор MYB	[9]
Размер зерна			
<i>GW2</i>	Хромосома 2	Белки RING-типа, функционируют как E3-убиквитин-лигазы	[30]
<i>GS3</i>	Хромосома 3	Регуляция формы зерна путем негативного влияния на рост	[32]
<i>GS5</i>	Хромосома 5	Положительный модулятор генов клеточного цикла	[29]
<i>TGW6</i>	Хромосома 6	Влияет на время перехода от синцитиальной к клеточной фазе	[8]
Окраска перикарпия			
<i>Rc</i>	Хромосома 7	Кодирует транскрипционный фактор bHLH	[53]
<i>Rd</i>	Хромосома 1	Кодирует белок DFR — восстановление дигидрофлавонолов до образования лейкоантоцианидинов	[53]
<i>Kala 1</i>	Хромосома 1	Кодирует белок DFR — восстановление дигидрофлавонолов до образования лейкоантоцианидинов	[60]
<i>Kala 3</i>	Хромосома 3	Кодирует транскрипционный фактор MYB	[60]
<i>OKala 4</i>	Хромосома 4	Кодирует транскрипционный фактор bHLH	[60]

Понимание генетического контроля признаков, ответственных за синдром доместикиции может помочь облегчить работу при выведении новых высокоурожайных и устойчивых сортов путем доместикиции *de novo*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Н.А. Миргородский, С.А. Слезова, Н.А. Добаркина — написание текста, обзор литературы; Т.В. Матвеева, Е.А. Андреева — концептуализация, внесение окончательных правок. Авторы одобрили версию для публикации, а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

ADDITIONAL INFO

Author contribution. N.A. Mirgorodskii – writing the text (section on pericarp coloration), literature review; S.A. Slezova – writing the text (section on grain size), literature review; N.A. Dobarkina – writing the text (section on seed shattering), literature review; T.V. Matveeva – conceptualization, final editing; E.A. Andreeva – conceptualization, final editing.

Funding sources. No funding.

Disclosure of interests.

Statement of originality. The authors did not use previously published information (text, illustrations, data) to create this paper.

Data availability statement. ...

Generative AI. ...

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Fuller DQ. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. *Ann Bot.* 2007;100(5):903–924. doi: 10.1093/aob/mcm048
2. Pankin A, von Korff M. Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of barley (*Hordeum vulgare*). *Curr Opin Plant Biol.* 2017;36:15–21. doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.001
3. Khush GS. Productivity improvements in rice. *Nutr Rev.* 2003;61(S6):S114–S116. doi: 10.1301/nr.2003.jun.S114-S116
4. Khush GS. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. *Proc Nutr Soc.* 2001;60:15–26. doi: 10.1079/PNS200075
5. Jiang LP, Liu L. New evidence for the origins of sedentism and rice domestication in the Lower Yangzi River, China. *Antiquity.* 2006;80(308):355–361. doi: 10.1017/S0003598X00093674
6. Wu H, He Q, Wang Q. Advances in rice seed shattering. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10):8889. doi: 10.3390/ijms24108889
7. Ji H-S, Chu S-H, Jiang W, et al. Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes. *Genetics.* 2006;173(2):995–1005. doi: 10.1534/genetics.105.054031.
8. Li Y, Fan C, Xing Y, et al. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet.* 2011;43(12):1266–1269. doi: 10.1038/ng.977
9. Nkouaya Mbanjo EG, Jones H, Isaguirre Caguiat XG, et al. Exploring the genetic diversity within traditional Philippine pigmented rice. *Rice.* 2019;12:27. doi: 10.1186/s12284-019-0281-2
10. Ishii T, Numaguchi K, Miura K, et al. *OsLG1* regulates a closed panicle trait in domesticated rice. *Nat Genet.* 2013;45(4):462–465. doi: 10.1038/ng.2567
11. Maity A, Lamichaney A, Joshi DC, et al. Seed shattering: A trait of evolutionary importance in plants. *Front Plant Sci.* 2021;12:657773. doi: 10.3389/fpls.2021.657773
12. Fuller DQ, Qin L, Zheng Y. et al. The domestication process and domestication rate in rice: spikelet bases from the Lower Yangtze. *Science.* 2009;323(5921):1607–1610. doi: 10.1126/science.1166605

13. Li C, Zhou A, Sang T. Rice domestication by reducing shattering. *Science*. 2006;311(5769):1936–1939. doi: 10.1126/science.1123604
14. Thurber CS, Hepler PK, Caicedo AL. Timing is everything: early degradation of abscission layer is associated with increased seed shattering in U.S. weedy rice. *BMC Plant Biol*. 2011;11:14. doi: 10.1186/1471-2229-11-14
15. Lin Z, Griffith ME, Li X, et al. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*. 2007;226(1):11–20. doi: 10.1007/s00425-006-0460-4
16. Roeder AHK, Ferrándiz C, Yanofsky MF. The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Curr Biol*. 2003;13(18):1630–1635. doi: 10.1016/j.cub.2003.08.027
17. Konishi S, Izawa T, Lin SY, et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science*. 2006;312(5778):1392–1396. doi: 10.1126/science.1126410
18. Yoon J, Cho L-H, Kim SL, et al. The BEL1-type homeobox gene *SH5* induces seed shattering by enhancing abscission-zone development and inhibiting lignin biosynthesis. *Plant J*. 2014;79(5):717–728. doi: 10.1111/tpj.12581
19. Zhou Y, Lu D, Li C, et al. Genetic control of seed shattering in rice by the *APETALA2* transcription factor *SHATTERING ABORTION1*. *Plant Cell*. 2012;24(3):1034–1048. doi: 10.1105/tpc.111.094383
20. Jiang L, Ma X, Zhao S, et al. The *APETALA2*-like transcription factor *SUPERNUMERARY BRACT* controls rice seed shattering and seed size. *Plant Cell*. 2019;31(1):17–36. doi: 10.1105/tpc.18.00304
21. Lin Z, Li X, Shannon LM, et al. Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals. *Nat Genet*. 2012;44(6):720–724. doi: 10.1038/ng.2281
22. Lv S, Wu W, Wang M, et al. Genetic control of seed shattering during African rice domestication. *Nat Plants*. 2018;4(6):331–337. doi: 10.1038/s41477-018-0164-3
23. Cao H, Zhuo L, Su Y, et al. Non-specific phospholipase C1 affects silicon distribution and mechanical strength in stem nodes of rice. *Plant J*. 2016;86(4):308–321. doi: 10.1111/tpj.13165
24. Sun P, Zhang W, Wang Y, et al. *OsGRF4* controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *J Integr Plant Biol*. 2016;58(10):836–847. doi: 10.1111/jipb.12473

25. Ning J, He W, Wu L, et al. The MYB transcription factor *Seed Shattering 11* controls seed shattering by repressing lignin synthesis in African rice. *Plant Biotechnol J*. 2023;21(5):931–942. doi: 10.1111/pbi.14004
26. Takeda S, Matsuoka M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet*. 2008;9(6):444–457. doi: 10.1038/nrg2342
27. Fitzgerald MA, McCouch SR, Hall RD. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends Plant Sci*. 2009;14(3):133–139. doi: 10.1016/j.tplants.2008.12.004
28. Sakamoto T, Matsuoka M. Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11(2):209–214. doi: 10.1016/j.pbi.2008.01.009
29. Harberd NP. Shaping taste: The molecular discovery of rice genes improving grain size, shape and quality. *J Genet Genom*. 2015;42(11):597–599. doi: 10.1016/j.jgg.2015.09.008
30. Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, et al. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nat Genet*. 2013;45(6):707–711. doi: 10.1038/ng.2612
31. Jakubowska A, Kowalczyk S. A specific enzyme hydrolyzing 6-O-(4-O)-indole-3-ylacetyl- β -d-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *J Plant Physiol*. 2005;162(2):207–213. doi: 10.1016/j.jplph.2004.05.015
32. Song X-J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*. 2007;39(5):623–630. doi: 10.1038/ng2014
33. Fan C, Xing Y, Mao H, et al. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet*. 2006;112(6):1164–1171. doi: 10.1007/s00122-006-0218-1
34. Liu JP, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *PNAS USA*. 2002;99(20):13302–13306. doi: 10.1073/pnas.162485999
35. O’Leary JM, Hamilton JM, Deane CM, et al. Solution structure and dynamics of a prototypical Chordin-like cysteine-rich repeat (von Willebrand factor type C module) from collagen IIA. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53857–53866. doi: 10.1074/jbc.M409225200
36. Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science*. 2003;301(5631):376–379. doi: 10.1126/science.1081288

37. Fan C, Xing Y, Mao H, et al. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet.* 2006;112(6):1164–1171. doi: 10.1007/s00122-006-0218-1
38. Mao H, Sun S, Yao J, et al. Linking differential domain functions of the *GS3* protein to natural variation of grain size in rice. *PNAS USA.* 2010;107(45):19579–19584. doi: 10.1073/pnas.1014419107
39. Shomura A, Izawa T, Ebana K, et al. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet.* 2008;40(8):1023–1028. doi: 10.1038/ng.169
40. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001;126(2):485–493. doi: 10.1104/pp.126.2.485
41. Nagata K, Yoshinaga S, Takanashi J-i, Terao T. Effects of dry matter production, translocation of nonstructural carbohydrates and nitrogen application on grain filling in rice cultivar Takanari, a cultivar bearing a large number of spikelets. *Plant Prod Sci.* 2001;4(3):173–183. doi: 10.1626/pp.4.173
42. Yang J, Zhang J, Wang Z, et al. Grain and dry matter yields and partitioning of assimilates in japonica/indica hybrid rice. *Crop Sci.* 2002;42(3):766–772. doi: 10.2135/cropsci2002.7660
43. Peng S, Khush GS, Virk P, et al. Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. *Field Crops Res.* 2008;108(1):32–38. doi: 10.1016/j.fcr.2008.04.001
44. Holton TA, Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell.* 1995;7(7):1071–1083. doi: 10.2307/3870058
45. Brown RC, Lemmon BE, Olsen O-A. Development of the endosperm in rice (*Oryza sativa* L.): cellularization. *J Plant Res.* 1996;109(4):301–313. doi: 10.1007/BF02344477
46. Mizutani M, Naganuma T, Tsutsumi K, Saitoh Y. The syncytium-specific expression of the *Oryza*;KRP3 CDK inhibitor: implication of its involvement in the cell cycle control in the rice (*Oryza sativa* L.) syncytial endosperm. *J Exp Bot.* 2010;61(3):791–798. doi: 10.1093/jxb/erp343
47. Xia D, Zhang Y, Zhang H, et al. How rice organs are colored: The genetic basis of anthocyanin biosynthesis in rice. *Crop J.* 2021;9(3):598–608. doi: 10.1016/j.cj.2021.03.013
48. Oikawa T, Maeda H, Oguchi T, et al. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. *Plant Cell.* 2015;27(9):2401–2414. doi: 10.1105/tpc.15.00310
49. Ciulu M, de la Luz Cádiz-Gurrea M, Segura-Carretero A. Extraction and analysis of phenolic compounds in rice: a review. *Molecules.* 2018;23(11):2890. doi: 10.3390/molecules23112890

50. Weng J, Gu S, Wan X, et al. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res.* 2008;18(12):1199–1209. doi: 10.1038/cr.2008.307
51. Gonçalves AC, Campos G, Martins Z, et al. Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review. *Pharmaceuticals.* 2021;14(7):690. doi: 10.3390/ph14070690
52. Meng L, Qi C, Wang Z, et al. Determinant factors and regulatory systems for anthocyanin biosynthesis in rice apiculi and stigmas. *Rice.* 2021;14:45. doi: 10.1186/s12284-021-00480-1
53. Furukawa T, Maekawa M, Oki T, et al. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *Plant J.* 2007;49(1):91–102. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02958.x
54. Chachar ZA, Zhou J, Li W, et al. Cloned genes and genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in maize, a comparative review. *Front Plant Sci.* 2023;15:1310634. doi: 10.3389/fpls.2024.1310634
55. Nagata S, Takahashi M. Attempt to construct twelve linkage groups in Japanese rice. *Japanese Journal of Genetics.* 1963;38(1):10–15.
56. Sweeney MT, Thomson MJ, Cho YG, et al. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *Plant Cell.* 2006;18(2):283–294. doi: 10.1105/tpc.105.038430
57. Vaughan LK, Ottis BV, Prazak-Havey AM, et al. Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? *Weed Sci.* 2001;49(4):468–476. doi: 10.1614/0043-1745(2001)049[0468:IARRFI]2.0.CO;2
58. Gu X-Y, Foley ME, Horvath DP, et al. Association between seed dormancy and pericarp color is controlled by a pleiotropic gene that regulates abscisic acid and flavonoid synthesis in weedy red rice. *Genetics.* 2011;189(4):1515–1524. doi: 10.1534/genetics.111.131169
59. Raju RS, Sahoo C, Hanjagi PS, Samai KC. Physiological and biochemical traits regulating preharvest sprouting resistance in rice. *ORYZA — Int J Rice.* 2023;60(1):140–149. doi: 10.35709/ory.2023.60.1.5
60. Gu X-Y, Kianian SF, Foley ME. Multiple loci and epistases control genetic variation for seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). *Genetics.* 2004;166(3):1503–1516. doi: 10.1534/genetics.166.3.1503
61. Tokmakov SV, Mukhina ZM, Bogomaz DI, Matveeva TV. Development of molecular marker for assessment of intraspecific polymorphism of *Rc* gene conditioning red pericarp in rice

Oryza sativa L. *Ecological genetics*. 2011;9(3):57–67. EDN: OKDPLB doi: 10.17816/ecogen9357-67

62. Alekseev VI, Grigoriev AM, Silin AN, Kosikov EN. Early diagnostics of rice red blotch based on the application of DNA marking. In: *VII Congress of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders dedicated to the 100th anniversary of the Department of Genetics, SPSU*. 2019. P. 1106. (In Russ.)
63. Zhu Y, Lin Y, Chen S, et al. CRISPR/Cas9-mediated functional recovery of the recessive *rc* allele to develop red rice. *Plant Biotechnol J*. 2019;17(11):2096–2105. doi: 10.1111/pbi.13125
64. Zelenskaya OV, Zelensky GL, Ostapenko NV, Tumanyan IG. Genetic resources of rice (*Oryza sativa* L.) with colored pericarp. *Vavilov journal of genetics and breeding*. 2018;22(3):296–303. doi: 10.18699/VJ18.363 EDN: XMHVCP
65. Maeda H, Yamaguchi T, Omoteno M, et al. Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line. *Breed Sci*. 2014;64(2):134–141. doi: 10.1270/jsbbs.64.134

ОБ АВТОРАХ

***Миргородский Никита Алексеевич**; адрес: Россия, 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1; eLibrary SPIN: 1057-6260; ORCID: 0009-0005-6662-0741; e-mail: i@nmirgorodskij.ru

Слезова Софья Алексеевна; e-mail: slezovas@mail.ru

Добаркина Надежда Александровна; ORCID: 0009-0009-4283-519X; e-mail: n.dobarkina@yandex.ru

Матвеева Татьяна Валерьевна, д-р биол. наук, профессор; ORCID: 0000-0001-8569-6665; eLibrary SPIN: 3877-6598; e-mail: radishlet@gmail.com

Андреева Елена Александровна, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0002-9326-3170; eLibrary SPIN: 7269-8240; e-mail: a.andreeva@spbu.ru

AUTHORS INFO

***Nikita A. Mirgorodskii**; address: 1 Olimpiiskii av., Sirius Federal Territory, 354340, Russia; eLibrary SPIN: 1057-6260; ORCID: 0009-0005-6662-0741; e-mail: i@nmirgorodskij.ru

Sofya A. Slezova; e-mail: slezovas@mail.ru

Nadezhda A. Dobarkina; ORCID: 0009-0009-4283-519X; e-mail: n.dobarkina@yandex.ru

Tatiana V. Matveeva, Dr. Sci. (Biology), Professor; address: 7–9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: 0000-0001-8569-6665; eLibrary SPIN: 3877-6598; e-mail: radishlet@gmail.com

Elena A. Andreeva, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0002-9326-3170; eLibrary SPIN: 7269-8240; e-mail: a.andreeva@spbu.ru

*Автор для переписки