

ГЕН ФЛАВОНОИД 3', 5'-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЯЧМЕНЯ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ

А.В. Вихорев¹, К.В. Стрыгина²

Научный руководитель: к.б.н. О.Ю. Шоева²

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия,

г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

²Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Россия,

г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: vihorev97@mail.ru

THE GENE FLAVONOID 3', 5'-HYDROXYLASE OF BARLEY AS A TARGET FOR EDITING

A.V. Vikhorev¹, K.V. Strygina²

Scientific Supervisor: O.Y. Shoeva, PhD²

¹Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

²Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva Ave., 10, 630090

E-mail: vihorev97@mail.ru

Abstract. *Secondary metabolites anthocyanins are synthesized by many higher plants including an important agricultural crop barley (*Hordeum vulgare* L.). The study of genes involved in the synthesis of anthocyanins is actual because of health benefits of these compounds. One of the least studied structural genes in this metabolic pathway are genes of cytochrome P450 family. The aim of this study was to identify, compare, and analyze duplicated paralogous copies of cytochrome P450-encoding flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes in a barley genome. We identified four F3'5'H gene copies in the barley genome using a database for not annotated sequences using BLAST. The available sequences have cytochrome P450 domain. One of the copies carries a frame-shift mutation damaging the functional P450 domain, which could lead to changes in gene function. The transcription activity of the detected genes in various parts of plant varied among the copies. It is assumed that the maintenance of these duplicated genes is probably related to their specialization – all copies of F3'5'H can participate in the synthesis of anthocyanin compounds in different parts of the plant.*

Введение. Вторичные метаболиты антоцианы синтезируются многими высшими растениями, включая важную сельскохозяйственную культуру ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) [1]. Ввиду пользы для здоровья данных соединений, изучение генов, вовлечённых в синтез антоцианов, является актуальной задачей. Одним из малоизученных структурных генов в данном метаболическом пути является флавоноид 3', 5'-гидроксилаза. Данный ген, принадлежащий к большому семейству генов цитохром P450, является необходимым компонентом в пути биосинтеза голубых и фиолетовых антоциановых пигментов [2]. Ранее было показано наличие у ячменя одной копии данного гена, тканеспецифично экспрессирующейся в алейроновом слое [3]. Цель данной работы – идентификация и функциональный анализ генов F3'5'H ячменя. На основе полученных данных о локализации, структурно-функциональной организации и регуляции данных генов в дальнейшем планируется разработать генетическую конструкцию для редактирования гена F3'5'H ячменя с помощью системы CRISPR-Cas9 с целью получения сортов с новыми хозяйственно-ценными признаками.

Материалы и методы исследования. Для поиска гомологичных последовательностей гена *F3'5'H* ячменя (GenBank MF679160) использовали базу данных неаннотированных геномных последовательностей IPK Barley BLAST Server (http://webblast.ipkgatersleben.de/barley_ibsc/). Для аннотирования выявленных последовательностей использовали программу FGENESH+. Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей было осуществлено с использованием MULTALIN v5.4.1. *In silico* анализ промотора был произведен с помощью PLACE. Филогенетический анализ был произведен в программе MEGA v6.06 с использованием алгоритма UPGMA. Для анализа аминокислотных последовательностей использовали сервис InterPro. В качестве растительного материала использовали почти изогенные линии Bowman (Таблица 1), предоставленные IPK GenBank (Гатерслебен, Германия). Растения выращивались в теплицах ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия) при 12-часовом световом дне при температуре 20-25°C. РНК из алейронового слоя была выделена с использованием набора Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). РНК из перикарпов, лемм и стеблей (с листовыми оболочками) была выделена с помощью ZR Plant RNA MiniPrep™ (Zymo Research, США). Полученная РНК была обработана Rnase-free Dnase set (QIAGEN, Германия). По матрице РНК была синтезирована одноцепочечная кДНК с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплификацию геномной ДНК и кДНК проводили с помощью ПЦР. Дизайн праймеров был выполнен с использованием программы OLIGO7. Продукты ПЦР разделяли на агарозном геле. Амплифицированные фрагменты выделяли из агарозного геля с использованием набора DNA Clean kit (Цитокин, Санкт-Петербург, Россия). Секвенирование ДНК проводилось на базе ЦКП «Геномика» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Таблица 1

Фенотипические характеристики использованных линий ячменя

| Название линии | Фенотипические характеристики | | |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|--------------|
| | Алейроновый слой | Перикарп и лемма | Стебель |
| BW (Bowman) | Неокрашенный | Неокрашенный | Неокрашенный |
| BA (Blue aleurone) | Голубой | Неокрашенный | Неокрашенный |
| PLP (Purple lemma and pericarp) | Неокрашенный | Фиолетовый | Фиолетовый |

Результаты. Были идентифицированы четыре копии гена *F3'5'H* (включая ранее выделенный ген *F3'5'H-1*): одна в четвертой хромосоме (*F3'5'H-1*), две в шестой хромосоме (*F3'5'H-2* и *F3'5'H-3*) и одна в седьмой хромосоме (*F3'5'H-4*) (рис. 1А). Почти все проанализированные последовательности генов *F3'5'H* одно- и двудольных организмов (рис. 1А) несут в своем составе два экзона. Исключением является ген *F3'5'H-1* ячменя – в его составе было обнаружено три экзона. Второй интрон у *F3'5'H-1*, вероятно, появился на более позднем этапе эволюции после дивергенции дублированных копий. В ходе анализа промоторов генов было выявлено множество мотивов, отвечающих за светозависимую активацию, что характерно для генов, вовлеченных в биосинтез флавоноидных соединений. Нами было показано, что все выявленные гены имеют домен, характерный для семейства гемсодержащих монооксигеназ, – Cytochrome P450, E-class, group I (IPR002401). Члены данного семейства участвуют в метаболизме физиологически активных соединений, в том числе у растений. Однако одна из копий, обозначенная нами

F3'5'H-3, несёт мутацию сдвига рамки считывания, нарушающую функциональный домен P450 (рис. 1б). С помощью разработанных нами и апробированных ген-специфичных маркеров в ходе анализа *in vitro* с помощью ОТ-ПЦР была проверена экспрессия данных генов на образцах кДНК, полученных из контрастных по окраске тканей почти изогенных линий Bowman (Таблица 1). Было показано, что тканеспецифичная экспрессия характерна только для *F3'5'H-1* (алеироновый слой зерновки).

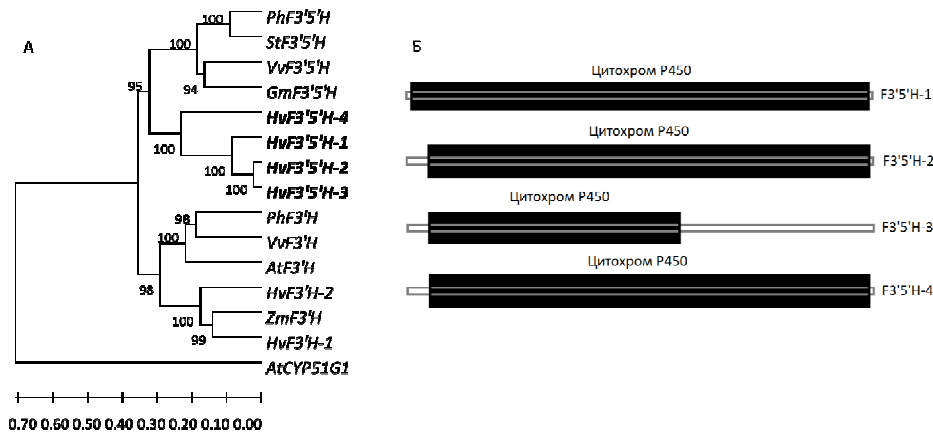


Рис. 1. Последовательности *F3'5'H*, выявленные в геноме ячменя. А) Филогенетический анализ последовательностей генов *F3'5'H* ячменя. Построение дерева на основе нуклеотидных последовательностей генов. MEGA 6.06, метод NJ. Б) Структурная организация генов *F3'5'H* ячменя. Чёрным цветом выделен функциональный домен цитохром P450

Заключение. Таким образом, в рамках настоящего исследования с помощью базы данных неанотированных последовательностей ячменя были идентифицированы последовательности генов биосинтеза антоцианов *F3'5'H*. С помощью разработанных праймеров на материале почти изогенных линий сорта Bowman была исследована экспрессия этих генов. Предполагается, что поддержание функций данных дублированных генов, вероятно, связано с их специализацией – все копии *F3'5'H* могут участвовать в синтезе флавоноидных соединений антоцианов в разных частях растения. Данная работа может позволить проводить ускоренную селекцию сортов продовольственного и кормового ячменя с повышенной пищевой ценностью зерна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. (2016). Molecular genetic mechanisms of the development of fruit and seed coloration in plants. Russian Journal of Genetics: Applied Research, no. 5, pp. 537-552.
2. Tanaka Y., Brugliera F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. Phil. Trans. R. Soc. B, no. 1612, pp. 20120432.
3. Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. (2017). Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. BMC plant biology, no. 1, pp. 184.