

КСЕНИЯ ВЛАДИМИРОВНА СТРИГИНА

**РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ У ВИДОВ ТРИБЫ
TRITICEAE**

Генетика – 03.02.07

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Елена Константиновна Хлесткина**
доктор биологических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты: **Кочиева Елена Зауровна**
доктор биологических наук, профессор, руководитель группы молекулярных методов анализа генома, ведущий научный сотрудник лаборатории системной биологии растений ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, г. Москва

Дивашук Михаил Георгиевич
кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биологии, г. Москва

Ведущее учреждение: **ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова**
Российской академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:
пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,
тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИГиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Регуляция экспрессии генов является важной компонентой существования любого организма, благодаря которой происходит постоянный контроль различных биологических процессов, таких как рост, деление клеток, реакция на окружающую среду или стресс. У многоклеточных в основе регуляции экспрессии генов лежат генетические и эпигенетические механизмы. Генетическая регуляция экспрессии генов происходит с помощью сложного механизма, контролируемого факторами транскрипции (ТФ). Данные белки влияют на уровень экспрессии генов-мишеней путём связывания с их *цис*-регуляторными элементами. Эпигенетическая регуляция осуществляется посредством модификаций ДНК, РНК или гистоновых белков. В частности, такой эпигенетический фактор, как метилирование ДНК по остаткам цитозина (mC), имеет важное значение для связывания ТФ с регуляторной областью генов. Таким образом, контроль экспрессии генов требует сложных взаимодействий белков в районах регуляторных элементов гена, при этом характер этого взаимодействия определяется как самой последовательностью ДНК, так и характером её метилирования.

Флавоноиды представляют разнородную группу вторичных растительных метаболитов. Различные флавоноидные соединения играют важную роль при регуляции роста и развития растений и их защите от абиотических и биотических факторов стресса (Grotewold, 2006; Gould et al., 2008). Растительная пища, богатая определёнными флавоноидами, является источником соединений, полезных для здоровья человека и домашних животных. Показано, что флавоноиды обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами; их потребление часто связывают с уменьшением риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний (Ren et al., 2003; Nema et al., 2015).

Система генов биосинтеза флавоноидов является удобной моделью для изучения особенностей эволюции, организации и регуляции транскрипции генов, поскольку изменение на генном уровне можно учитывать на уровне фенотипа по изменению окраски. У таких важных зерновых культур, как ячмень (*Hordeum vulgare* L., геном HH, $2n = 2x = 14$) и пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L., геном BBAADD, $2n = 6x = 42$), последовательности многих ключевых генов пути биосинтеза флавоноидов определены, для некоторых из них идентифицированы паралогичные и гомеологичные копии (Хлесткина, 2012; Шоева и др., 2018). Однако механизмы регуляции тканеспецифической экспрессии данных копий генов до сих пор слабо исследованы. Наименее изученными в этом плане остаются регуляторные гены, кодирующие транскрипционные факторы типа Мус (bHLH), Муб и WD40 (образующие регуляторный комплекс Муб + bHLH +

WD40 (MBW), с одной стороны, и эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов данного пути, с другой стороны.

Для решения данной задачи, а также для исследования генетических механизмов формирования флавоноидной окраски различных органов у представителей трибы Triticeae в данной работе были использованы генетические модели (почти изогенные линии), дающие возможность провести сравнительное исследование ортологичных, гомеологичных и паралогичных генов и установить роль генетических и эпигенетических механизмов в регуляции их тканеспецифичной экспрессии в ходе биосинтеза флавоноидов.

Цель и задачи исследования. Цель работы – установить роль дублированных копий регуляторных и структурных генов биосинтеза флавоноидов в тканеспецифичной регуляции синтеза этих соединений у видов трибы Triticeae. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить с помощью поиска по гомологии полноразмерные последовательности гомеологичных и паралогичных копий регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae.
2. Провести сравнительный анализ структурно-функциональной организации дублированных регуляторных генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40*.
3. Выявить особенности эволюции гомеологичных и паралогичных копий генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae.
4. Определить характер экспрессии генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* в различных органах и тканях почти изогенных линий пшеницы *Triticum aestivum* и ячменя *Hordeum vulgare*.
5. Охарактеризовать паттерны метилирования ДНК промоторов различных дублированных копий генов биосинтеза флавоноидов пшеницы *T. aestivum*: регуляторного bHLH-кодирующего гена *TaMyc-A1* и структурных генов *TaF3H* и *TaCHI*.

Научная новизна работы. В ходе данной работы были получены новые данные об особенностях регуляции тканеспецифической экспрессии генов биосинтеза флавоноидов в трибе Triticeae. А именно, среди представителей семейств *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* у видов трибы Triticeae были идентифицированы гены-кандидаты, предположительно вовлечённые в регуляцию синтеза флавоноидов, при этом представители семейства *WD40*, регулирующие биосинтез флавоноидов, в данной трибе были описаны впервые. Благодаря анализу полноразмерных последовательностей генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40*, были продемонстрированы их филогенетические взаимоотношения, а также оценены скорости эволюции представителей данных семейств генов. Впервые был найден *Myc*-кодирующий ген, предположительно являющийся фактором, определяющим антоциановую окраску coleoptiles мягкой пшеницы – *TaMyc-B1*. Впервые было показано, что функциональный аллель *Myc*-кодирующего гена *HvMyc2* ячменя, является ключевым регулятором синтеза антоцианов в

алейроновом слое ячменя. Была предложена роль гена *HvMpc1-H3* как *Myb*-кодирующего сорегулятора гена *HvMyc2*, запускающего тканеспецифический биосинтез антоцианов. Кроме того, анализ паттернов метилирования промоторов регуляторного *TaMyc-A1* и структурных *TaF3H* и *TaCHI* генов биосинтеза флавоноидов позволяет сделать вывод о том, что характер роли метилирования промоторов данных генов в оптимальных условиях выращивания не является критичным.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате настоящего исследования были получены новые знания о роли факторов транскрипции и паттерна метилирования ДНК промоторов регуляторных и структурных генов в регуляции экспрессии генов биосинтеза флавоноидов. Были разработаны CAPS-маркеры к ранее неаннотированным генам *HvMpc1-H2* и *HvMyc2* ячменя, с помощью которых удалось точно нанести данные последовательности на молекулярную карту. Данные маркеры могут быть эффективно использованы в практической селекции для маркер-контролируемого отбора генотипов ячменя при создании сортов с высоким содержанием антоцианов в зерне. Сведения об отличиях аллельных вариантов изученных регуляторных генов могут быть использованы для геномного редактирования ячменя, направленного на получение ячменя с повышенной диетической ценностью.

Положения, выносимые на защиту.

1. У представителей трибы Triticeae гены *WD40* эволюционируют медленнее, чем гены *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*.
2. Ген *HvMyc2* контролирует голубую окраску зерна ячменя.
3. Характер метилирования промоторов генов биосинтеза флавоноидов мягкой пшеницы не является ключевым в регуляции их транскрипции.

Вклад автора. Все научные результаты были получены автором самостоятельно.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на двенадцати научных конференциях и школах молодых учёных в виде устных и стендовых докладов. По материалам работы опубликованы три статьи в российских и зарубежных рецензируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, перечня условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 157 страницах, содержит 29 рисунков и 17 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В настоящей работе были использованы современные методы молекулярной генетики: *in silico* поиск и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (BLASTN, MULTALIN, MEGA, FGGENESH+, New PLACE, InterPro, SWISS-MODEL) и конструирование праймеров для ПЦР (OLIGO);

выделение РНК и ДНК растений; обратная транскрипция; ПЦР и количественная ПЦР; выделение, очистка, клонирование и секвенирование ПЦР-фрагментов; молекулярно-генетическое картирование идентифицированных генов (двуродительская популяция OWB); анализ паттернов метилирования нуклеотидных последовательностей методом бисульфитного секвенирования. В качестве растительного материала были использованы коллекции почти изогенных линий и сортов пшеницы и ячменя из коллекций ИЦиГ СО РАН и IPK GenBank.

Результаты и обсуждение

Эволюция генов MBW-комплекса трибы Triticeae.

В базах данных неаннотированных геномных последовательностей мягкой пшеницы (*T. aestivum*), её сородичей (диплоидные и тетраплоидные пшеницы рода *Triticum*, а также диплоидные виды рода *Aegilops* с геномами родственными геномам В и D пшеницы) и ячменя (*H. vulgare*) был проведён BLASTN-поиск последовательностей, гомологичных известным регуляторным генам биосинтеза антоцианов, кодирующим факторы из комплекса MBW: *R2R3-Myb* (для поиска использовали последовательность *HvAnt1* в хромосоме 7HS ячменя и гомологи в хромосомах 7AS, 7BS и 7DS пшеницы), *bHLH-Myc* (по гомологии с *HvAnt2/HvMyc1* в хромосоме 2HL ячменя и *TaMyc1* в хромосоме 2AL пшеницы), *WD40* (по гомологии с *ZmPAC1* кукурузы). В результате выявлены и охарактеризованы представители семейств – ортологи и паралоги генов, последовательности которых использовались для поиска.

R2R3-Myb. До настоящей работы гены, кодирующие факторы транскрипции *R2R3-Myb*, связанные с биосинтезом флавоноидных пигментов антоцианов, были известны и локализованы в седьмой гомеологической группе хромосом: *TaC1* в хромосомах пшеницы 7A, 7B и 7D и *HvAnt1/HvMpc1* в хромосоме ячменя 7H (Himi et al., 2015; Shoeva et al., 2015). Однако данные, полученные ранее при Саузерн-блот анализе нуллитетрасомных линий пшеницы (Li et al., 1999), указывали на присутствие высоко гомологичных последовательностей в хромосомах четвертой гомеологической группы. В данной работе эти последовательности впервые были идентифицированы как у пшеницы, так и у других представителей трибы Triticeae. Показано, что они объединяются в 2 группы: *Mpc1-2* и *Mpc1-3* (Рис.1). Известные гены в седьмой гомеологической группе были обозначены *Mpc1-1* в соответствии с наименованиями генов, предложенными Li et al. (1999). Уровень идентичности между копиями *Mpc1-1* и *Mpc1-2/Mpc1-3* составляет около 70 %. Среди пяти выявленных генов *Mpc1-2* мягкой пшеницы три (*TaMpc1-A2*, *TaMpc1-B2*, *TaMpc1-D2*) являются гомеологами, произошедшими от дупликации гена *Mpc1* общего предка трибы Triticeae. Согласно нашим расчётам, дупликация, приведшая к появлению копий в хромосомах 4 и 7, произошла около 18,8 млн лет назад. Эти копии сохранились

у остальных изученных диплоидных и тетраплоидных видов, включая ген ячменя *HvMpc1-H2* (Рис.1).

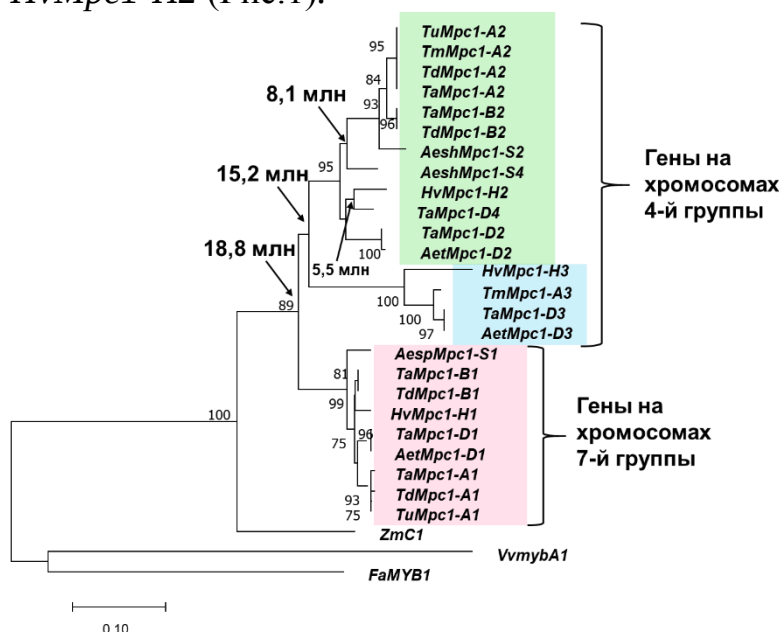


Рис. 1. Анализ филогенетического сходства генов *Mpc1* (CDS). MEGA 6.06, метод Neighbor-Joining.

Образование группы *Mpc1-3*, как показали расчёты, произошло около 15,2 млн лет назад. При этом данная группа включает только ген *TaMpc1-D3* мягкой пшеницы и его ортологи у *T. monosocum*, *Ae. tauschii* и ячменя (*HvMpc1-H3*). Вероятно, гены *Mpc1-3* были сильнее всего подвержены

псевдогенизации и элиминации из геномов растений трибы Triticeae. Данная гипотеза подтверждается тем, что соотношение *Ka/Ks* для генов данной группы (~0,797) было самым большим в сравнении с генами *Mpc1-1* (~0,664) и *Mpc1-2* (~0,688). Таким образом, эти гены в меньшей степени подвергнуты стабилизирующему отбору.

bHLH-Мус. На основании известных генов-регуляторов биосинтеза антоцианов в зерновке злаков *HvMusc1* и *TaMusc1* в геномах проанализированных видов трибы Triticeae было выявлено две группы последовательностей: гены *Musc1* (хромосомы 2L), к которым относятся пять генов пшеницы мягкой, включая *TaMusc1* (в настоящей работе – *TaMusc-A1*), и ген ячменя *HvMusc1*, и группа *Musc2* (хромосомы 4L), к которой относятся ранее неаннотированные шесть последовательностей пшеницы и один ген ячменя (Рис.2). Кодировующие последовательности генов *Musc1* и *Musc2* имеют ~70% идентичности. При этом в среднем значение *Ka/Ks* для них близко к 0,790. Анализ времени дивергенции показал, что первая дупликация гена *Мус* у общего предка трибы Triticeae, приведшая к появлению копий в хромосомах 2 и 4, произошла около 19,2 млн лет назад (Рис.2). Последующие основные дупликационные события в хромосоме 2 происходили после дивергенции родов *Triticum/ Aegilops* и *Hordeum*, в то время как в хромосоме 4 основные дупликации происходили до их дивергенции (Рис.2). Среди них дупликация, которая привела к образованию генов *HvMusc2* у ячменя и *Musc2.6* у предка D-генома около 16,3 млн лет назад. Значимые эволюционные события генов *R2R3-Myb* происходили вслед за таковыми *bHLH-Мус* генов. Первое дупликационное событие случилось 18,8 и 19,2 млн лет назад, второе – 15,2 и 16,3 млн лет назад, соответственно (Рис.1 и 2). Возможно, эволюционные

изменения в семействе *bHLH*-Мус способствовали закреплению тех или иных изменений, происходивших с партнером по регуляторному комплексу MBW.

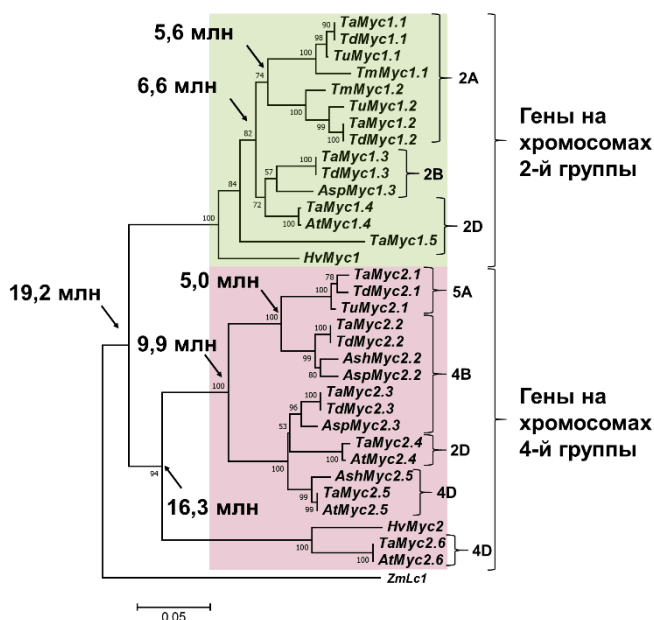


Рис. 2. Анализ филогенетического сходства генов *Мус* (CDS). MEGA 6.06, Neighbor-Joining.

WD40. Белки семейства WD40 являются немногочисленным классом факторов транскрипции. Данные ТФ вовлечены в регуляцию многих процессов в клетке, таких как клеточная дифференцировка, реакция на биотические и абиотические стрессы, образование корневых волосков и трихом, а также синтез фенольных соединений, включая флавоноиды (Feller et al., 2011). У

представителей трибы Triticeae долгое время не было информации о локализации и первичной структуре WD40-кодирующих генов, способных регулировать синтез флавоноидов. На основании гена кукурузы *ZmPAC1* в данном исследовании на длинном и коротком плечах в хромосомах 6-й группы у всех изученных видов были найдены гены, обозначенные WD40-1, кластеризующиеся с *ZmPAC1*, и группа генов WD40-2, соответственно (Рис.3).

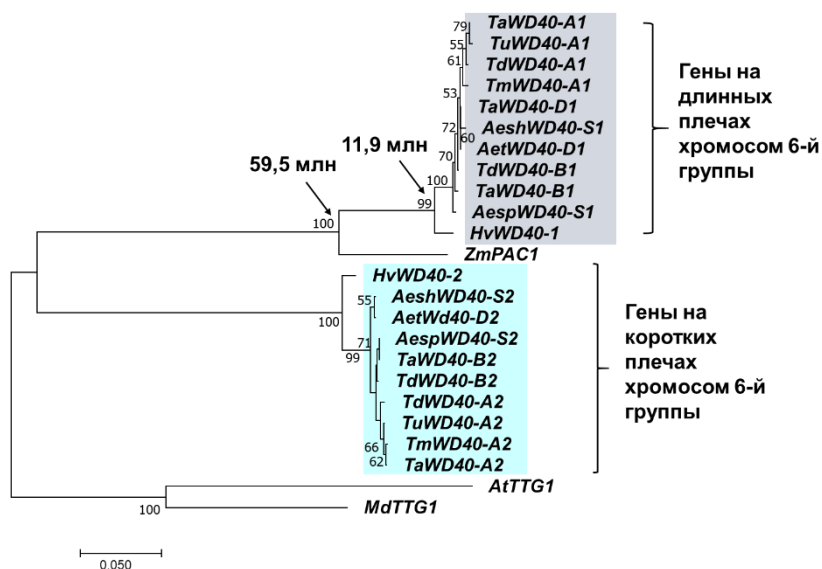


Рис. 3. Анализ филогенетического сходства генов WD40. MEGA 6.06, Neighbor-Joining.

Уровень идентичности между копиями WD40-1 и WD40-2 составляет около 60%. По отношению *Ka/Ks* было определено, что последовательности WD40 находятся под действием стабилизирующего отбора, поскольку в среднем данное значение близко к

0,21. Было установлено, что дупликация WD40-1/WD40-2 произошла намного раньше дивергенции *Triticum* и *Hordeum* (оценено как 11,9 млн лет назад) и *Zea* и *Triticum* (оценено как 59,5 млн лет назад), возможно, на ранних этапах эволюции

однодольных растений (Рис.3). Несмотря на то, что дивергенция между данными копиями произошла намного раньше событий, описанных выше для генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Мус*, степень гомологии между полными кодирующими последовательностями копий *WD40-1* и *WD40-2* сопоставима с *Myb* и *Мус*. Поскольку данные белки регулируют столь разнообразные и важные клеточные процессы, то рабочее состояние генов, как и их первичная последовательность, в большей степени поддерживается отбором.

Гены MBW-комплекса ячменя

Исследование относительного уровня экспрессии генов *HvМус*, *HvМрс1* и *HvWD40* ячменя проводилось на кДНК тканей алейрона, перикарпа, цветковой чешуи и стебля почти изогенных линий Bowman (BW), контрастных по антоциановой пигментации. В результате был выявлен тканеспецифический паттерн экспрессии гена *HvМус2* – он экспрессировался только в тканях алейрона и цветковой чешуи, причём в линии BA (blue aleurone - голубая окраска алейрона) экспрессия была выше в 8,6 раз, чем в неокрашенной линии BW (Рис.4). Сравнение последовательностей гена *HvМус2* у данных линий выявило однонуклеотидную инсерцию, приводящую к сдвигу рамки считывания у BW. Потенциально ген *HvМус2* является компонентой bHLH-Мус регуляторного комплекса MBW, специфично контролирующего синтез антоцианов в алейроне. Другая компонента данного комплекса, *R2R3-Myb*, вероятно кодируется геном *HvМрс1-НЗ*, который проявил тканеспецифический характер экспрессии в алейроновом слое ячменя, при этом в линии BA экспрессия этого гена была в 8 раз выше, чем в BW (Рис.4).

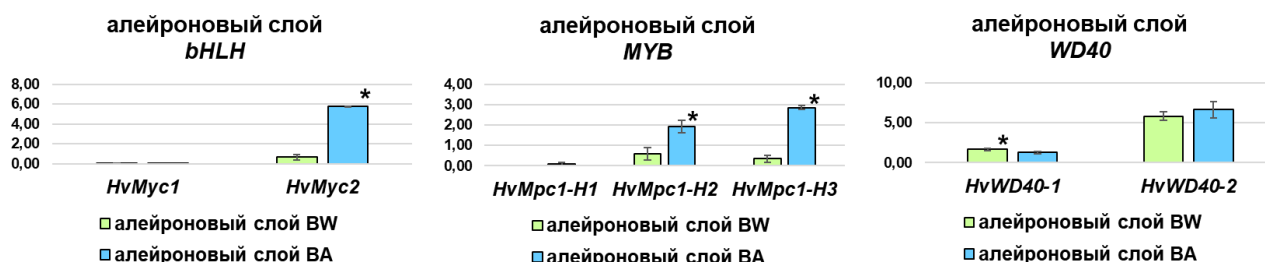


Рис. 4. Относительный уровень мРНК генов в *HvМус*, *HvМрс1* и *HvWD40* в тканях почти изогенных линий сорта Bowman. Цвет столбцов соответствует цвету анализируемой ткани. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась U-тестом. *различия статистически значимы между Bowman и NIL при $p \leq 0,05$.

Гены *HvWD40-1* и *HvWD40-2* экспрессируются на высоком уровне во всех проанализированных цветных и неокрашенных тканях и не имеют аллельных различий среди разных генотипов. Гены *WD40* других видов растений (например, картофеля) имеют несколько другой профиль экспрессии, который соотносится с интенсивностью цвета ткани (Pauyavula et al., 2013). У ячменя отмечена лишь слабая тканевая специфичность – ген *HvWD40-2* проявил повышенную экспрессию в тканях зерновки (Рис.4). Вероятно, *HvWD40-2* – третья компонента

комплекса MBW синтеза антоцианов в алейроне ячменя. Полученные данные о компонентах данного комплекса позволили соотнести их с локусами *Blx* (*non-blue aleurone xenia*), ранее картированными у ячменя на основе оценки фенотипа сегрегирующих популяций. Было известно, что хромосома 4Н ответственна за контроль появления голубой окраски алейрона и несёт три тесно сцепленных гена *Blx*: *Blx1*, *Blx3*, *Blx4* (Mullick et al., 1958; Finch et al., 1978). Сравнение положения гена *HvMyc2* на хромосоме 4НL (в настоящей работе установлена точная внутрехромосомная локализация данного гена, он тесно сцеплен с маркером *XBmac186-4H*)) и сопоставление с кластером *Blx1* / *Blx3* / *Blx4* (Franckowiak, 1997) привело к выводу об их колокализации. Сопоставление точного положения генов *HvMpc1-H3* (chr4H:533784301-533784970) и *HvMyc2* (chr4H:534044159-534066299) (а также структурного гена *HvF3'5'H-1* (*Blx4*)) (Strygina et al., 2017), участвующего в биосинтезе голубых антоциановых пигментов в алейроновом слое ячменя – chr4H:534190658-534192411) позволяет сделать вывод о том, что гены *HvMpc1-H3* и *HvMyc2* соответствуют локусам *Blx1* и *Blx3*, соответственно.

Гены MBW-комплекса пшеницы

R2R3-Myb. Гены *Mpc1-1* являются специфическими регуляторами биосинтеза антоцианов (Шоева и др., 2018; Khlestkina et al., 2015). В данной работе была определена экспрессия ранее неисследованных генов *Mpc1-2*, *Mpc1-3* и *Mpc1-4*. Было показано, что почти все эти гены транскрипционно активны и характеризуются тканеспецифическим паттерном экспрессии. Гены *TaMpc1-A2*, *TaMpc1-B2* и *TaMpc1-D2* продемонстрировали активность в coleoptile, ген *TaMpc1-D4* экспрессировался как в coleoptile, так и в перикарпе пшеницы. Однако все проанализированные гены не транскрибировались в корнях растения, а ген *TaMpc1-D3* не экспрессировался ни в coleoptile, ни в перикарпе. При использовании количественной ОТ-ПЦР был определён относительный уровень экспрессии генов в сортах и линиях пшеницы, отличающихся антоциановой пигментацией. Оказалось, что только в случае гена *TaMpc1-A2* уровень экспрессии меняется в зависимости от окраски coleoptile почти всех проанализированных образцов пшеницы (Рис.5).

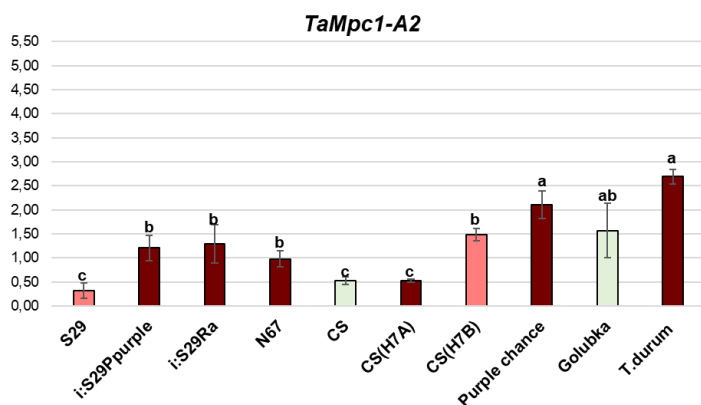


Рис. 5. Относительный уровень мРНК гена *TaMpc1-A2* в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет столбца соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. * различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Предположительно, *TaMpc1-A2* может участвовать в синтезе неокрашенных предшественников антоцианов в coleoptile пшеницы как совместный регулятор генов *Mpc1-1*.

bHLH-Мус. Специфические особенности ранее были определены для гена *TaMyc1* (*TaMyc-A1*), который вместе с Myb-кодирующими генами *TaMpc1-1* контролирует биосинтез антоцианов в перикарпе зерновки (Shoeva et al., 2014b; Jiang et al., 2018). Чтобы исследовать, могут ли другие Мус-гены быть связаны с синтезом антоцианов в других частях растения пшеницы, была проведена количественная ПЦР при использовании генотипов пшеницы с неокрашенным, светло-красным и темно-красным coleoptile. Было продемонстрировано, что экспрессия данных генов не связана с пигментацией coleoptile, однако экспрессия *TaMyc-A1* на 5-й день после прорастания семян была намного выше (почти в 8-15 и 13-25 раз, соответственно) в coleoptile двух генотипов i:S29*Pp-A1Pp-D1Pp*^{3P} и Purple chance (носители доминантного аллеля *TaMyc-A1*) по сравнению со всеми другими генотипами (Рис.6). Высокий уровень экспрессии *TaMyc-A1* может объяснить появление темно-красного цвета coleoptile в i:S29*Pp-A1Pp-D1Pp*^{3P} и Purple chance, однако этот ген не может считаться основным регулятором накопления антоцианов в coleoptile, поскольку линии с такой же пигментацией coleoptile (i:S29*Ra*, CS(Hope 7A), Новосибирская 67) не имеют сопоставимый уровень экспрессии *TaMyc-A1*.

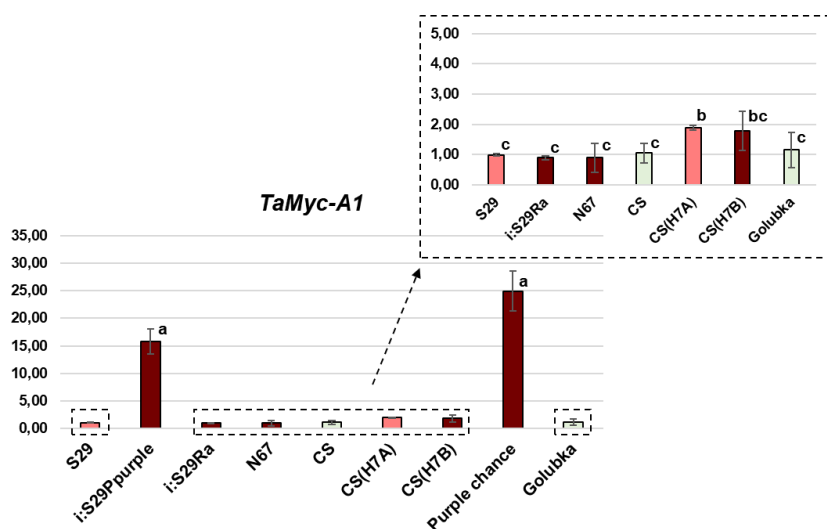


Рис. 6. Относительный уровень мРНК гена *TaMyc-A1* в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания). Цвет колонки соответствует цвету coleoptile. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. * различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Поскольку количественная ПЦР на 5-й день после прорастания не выявила связи между относительным уровнем экспрессии генов Мус и наличием антоцианов в coleoptile, был проведён анализ, определяющий относительный уровень экспрессии данных генов в динамике развития пшеницы со 2-го по 5-й день после прорастания с использованием 3 генотипов: Chinese Spring с неокрашенным coleoptile, Саратовская 29 и Chinese Spring (Hope7A) со светлой и тёмной окраской, соответственно. В результате были обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии гена *TaMyc-B1* между сестринскими

линиями Chinese Spring и Chinese Spring (Hope7A) на ранних стадиях развития (Рис.7).

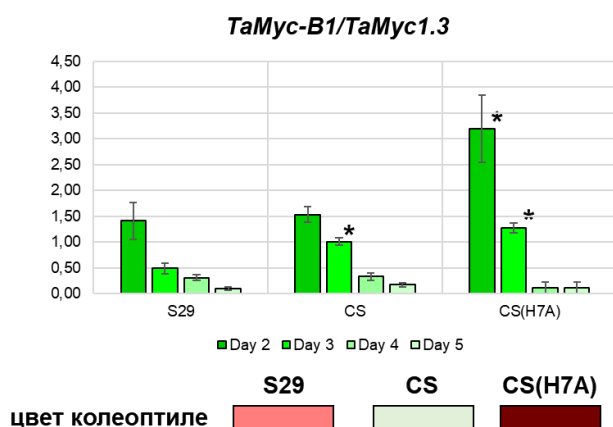


Рис. 7. Относительный уровень мРНК гена *TaMyc-B* второй гомеологической группы хромосом в coleoptile во время развития пшеницы (со 2-го по 5-й день). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась *U*-тестом. *различия статистически значимы между Bowman и NIL при $p \leq 0,05$.

Эти генотипы отличаются аллельным состоянием гена *TaMpc1-A1*, считающимся Myb-кодирующим регулятором синтеза антоцианов в coleoptile. Привнесение доминантного гена *TaMpc1-A1* в геном Chinese Spring вызывает увеличение экспрессии гена *TaMyc-B1* в 2 раза. Предполагается, что фактор bHLH-Мус, кодируемый геном *TaMyc-B1*, может быть основным основным партнером R2R3-Myb, кодируемого геном *TaMpc1-A1*, в MBW-комплексе, контролирующем синтез антоцианов в coleoptile.

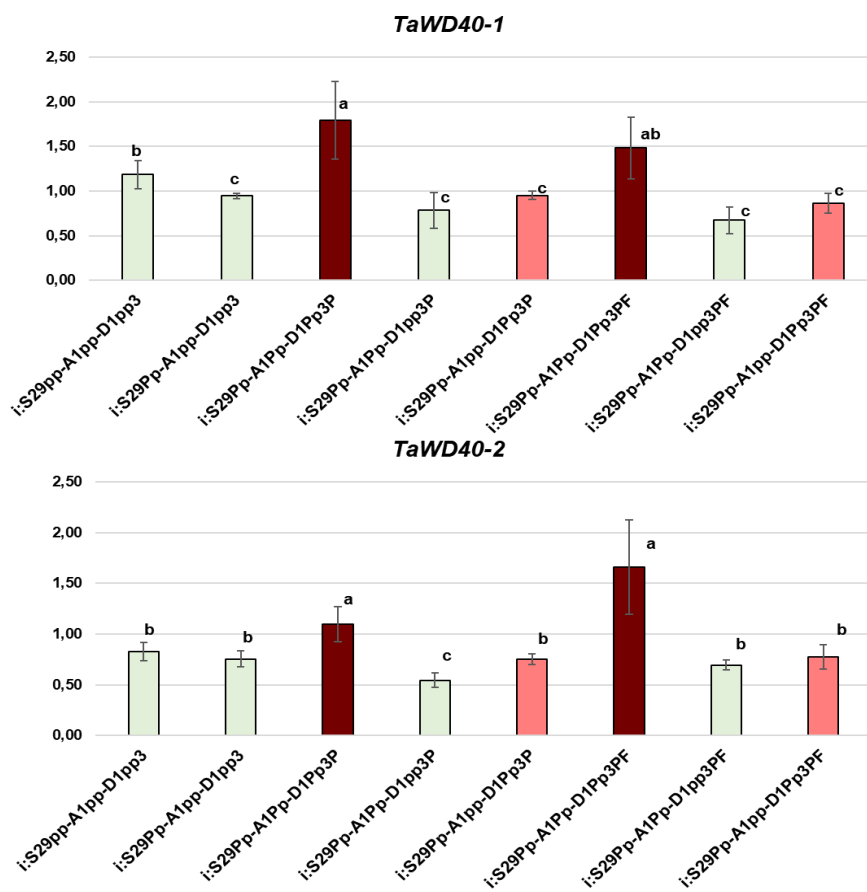


Рис. 8. Относительный уровень мРНК генов *TaWD40-1* и *TaWD40-2* в перикарпе пшениц, имеющих различную окраску. Цвет столбца соответствует цвету перикарпа. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. * различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

WD40. Суммарная экспрессия генов *WD40* пшеницы в корне, coleoptile и перикарпе пшеницы Саратовская 29 была оценена при использовании количественной ПЦР. Данные гены оказались транскрипционно

активны во всех проанализированных тканях. При этом для них была отмечена тенденция к увеличению уровня экспрессии в генотипах, несущих доминантные гены *TaMpc1-A1*, *TaMpc1-D1* и *TaMyc-A1*, т.е. обладающих интенсивной окраской перикарпа (Рис.8). Отсутствие связи между уровнем мРНК в колеоптиле пшениц и окраской ткани (как в нормальных условиях, так и в условиях стресса) может свидетельствовать о перикарп-специфической вовлеченности данных генов в синтез антоцианов.

Анализ экспрессии генов в ответ на стресс.

Обнаружение стресс-зависимых элементов в промоторах генов *R2R3-Myb*, *bHLH-Myc* и *WD40* побудило провести сравнительный анализ их уровней экспрессии в ответ на засуху и солевой стресс. Относительные уровни мРНК генов измеряли в колеоптиле растений Саратовская 29 в ответ на обработку 10% ПЭГ или 0,2М NaCl и сравнивали с таковым в контроле (в дистиллированной воде). Уровень мРНК, сопоставимый с окраской колеоптиле пшеницы, был детектирован только для генов *bHLH-Myc* второй гомеологической группы хромосом – он значительно увеличился в проростках пшеницы, подверженных воздействию 10% ПЭГ (Рис. 9). Солевой стресс индуцировал экспрессию только генов *TaMyc-B1* и *TaMyc-A2*. Уровень мРНК *TaMyc-A1* снижался, а *TaMyc-D2* значимо не изменялся в ответ на обработку 0,2 М раствором NaCl. За исключением *TaMyc-A1* изменение уровней мРНК изученных генов в ответ на стресс было сопряжено с изменением содержания антоцианов в колеоптиле.

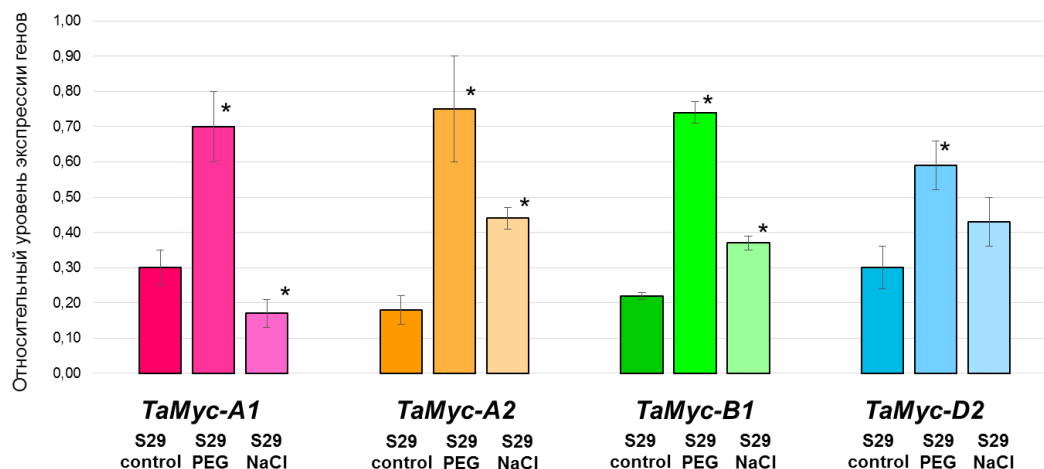


Рис. 9. Относительный уровень мРНК генов *bHLH-Myc* второй гомеологической группы хромосом в колеоптиле пшеницы при солевом стрессе и засухе (на 4-й день после прорастания). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. * различия статистически значимы между стрессом и контролем при $p \leq 0,05$ (*U*-тест).

Засуха и засоление вызывают такие негативные эффекты в клетке растения, как осмотический и окислительный стресс, репрессия фотосинтеза, повреждение клеточных компонентов и нарушение обмена веществ. Различные флавоноидные вещества участвуют в осморегуляции, защите фотосинтетического аппарата и

плазматической мембраны, нейтрализации свободных радикалов, возникающие при окислительном стрессе (Khlestkina, 2013). Результаты, полученные в настоящей работе, указывают на то, что гены *bHLH-Мус* могут участвовать в повышении толерантности пшеницы к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Роль паттернов метилирования ДНК цис-регуляторных районов дублированных генов, вовлечённых в синтез фенольных соединений.

Была высказана гипотеза о том, что специфичность экспрессии отдельных копий генов биосинтеза флавоноидов может быть связана с различием паттернов метилирования одних и тех же копий в разных тканях.

TaF3H и TaCHI. Ранее показана функциональная дивергенция между некоторыми копиями структурных генов *F3H* (флаванон 3-гидроксилаза) и *CHI* (халконфлаванонизомераза) биосинтеза флавоноидов пшеницы (Khlestkina et al., 2013; Shoeva et al., 2014). Анализ паттернов метилирования *цис*-регуляторных областей регуляторного гена генов *TaF3H-B2* (специфично экспрессируется в корнях) и *TaF3H-B1* (не экспрессируется в корнях, но экспрессируется в других различных частях растения, включая coleoptile) на основе метода бисульфитного секвенирования не выявил различий при сравнении метилирования промотора одного и того же гена в корне и coleoptile (Рис. 10). Промоторы генов *TaCHI-A1* (сильно экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне), *TaCHI-B1* (слабо экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне) и *TaCHI-D1* (сильно экспрессируется в coleoptile, не экспрессируется в корне) вовсе оказались неметилированными как в корнях, так и в coleoptile (Рис. 10).

TaМус-A1. Также нами был охарактеризован паттерн метилирования промотора регуляторного гена *TaМус-A1*. Данный ген отвечает за отличия на уровне фенотипа по признаку антоциановой окраски перикарпа (Shoeva et al., 2014b). В связи с этим проверялась гипотеза о возможной роли паттернов метилирования промоторов у генотипов, отличающихся контрастным фенотипом: почти изогенные линии пшеницы Саратовская 29 и i:S29Pr-A1Pr-D1Pr3^P. Однако высказанная гипотеза не подтвердилась (Рис. 10).

Таким образом, в данной работе было выявлено, что в специфичном характере регуляции экспрессии изученных структурных и регуляторного генов биосинтеза фенольных соединений флавоноидов, по всей видимости, играют роль не характер метилирования ДНК анализируемой области, а специфичность экспрессии регуляторных факторов и структура промоторов копий генов. В частности, доминантный (транскрибируется в перикарпе) и рецессивный (нет экспрессии) аллели гена *TaМус-A1* идентичны по первичной структуре (Shoeva et al., 2014b). Недавно различие между аллелями *TaМус-A1* было обнаружено в изменении счёт tandemно дублированного элемента длиной 260 п.н. в промоторе (Yang et al., 2017). Дупликация этого элемента приводит к активации

экспрессии *TaMyc-A1* и появлению пигмента в перикарпе пшеницы. Причины изменения экспрессии проанализированных структурных генов остаются невыясненными.

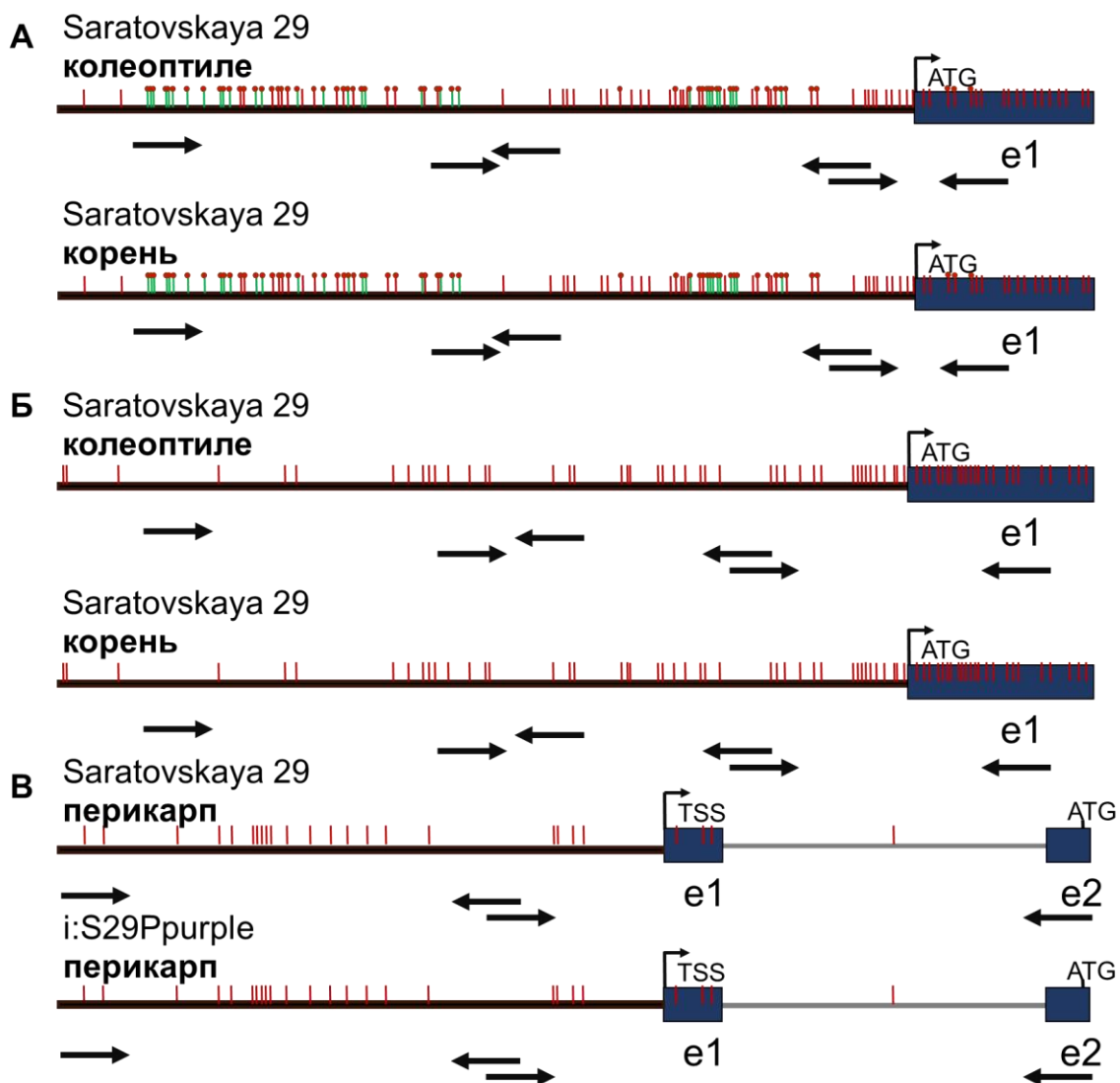


Рис. 10. Паттерны метилирования промоторных областей генов: А) *TaF3H-B1* (737 п.н.), Б) *TaCHI-A1* (799 п.н.), В) *TaMyc-A1* (748 п.н.). Стрелки обозначают праймеры. Вертикальные красные штрихи – предсказанные сайты метилирования. Вертикальные зелёные штрихи – обнаруженные неканоничные сайты метилирования. Красные круги – обнаруженные сайты метилирования

ВЫВОДЫ

1. С помощью *in silico* анализа геномов представителей трибы Triticeae были идентифицированы и аннотированы высоко гомологичные последовательности регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *bHLH-Мус* (2 копии для ячменя, 11 копий для пшеницы), *R2R3-Myb* (3 копии для ячменя, 8 копий для пшеницы) и *WD40* (2 копии для ячменя, 5 копий для пшеницы).

2. Было показано, что из генов биосинтеза флавоноидов, входящих в регуляторный комплекс MBW, у представителей трибы Triticeae гены *WD40* более консервативны в отличие от быстро эволюционирующих генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*.
3. Благодаря изучению структурной организации и транскрипционной активности генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Myc*, было установлено, что их дублированные копии, несмотря на приобретение функциональных отличий, остаются значимыми для пути биосинтеза флавоноидов.
4. Было показано, что различия в аллельном состоянии гена *HvMyc2* ячменя сопряжено с фенотипическими отличиями по признаку голубой окраски алейронового слоя, а его положение на генетической карте совпадает с локусом, контролирующим данный признак.
5. Сравнительный анализ экспрессии генов *bHLH-Myc* второй гомеологической группы хромосом в проростках различных линий пшеницы, контрастных по содержанию окрашенных флавоноидных пигментов, позволил предположить, что неизвестный до сих пор фактор *bHLH-Myc* комплекса MBW, активирующего синтез антоцианов в coleoptile в оптимальных условиях, вероятно, кодируется геном *TaMyc-B1*. В стрессовых условиях в активации антоцианов наряду с *TaMyc-B1* могут потенциально участвовать и другие гомеологичные копии.
6. В результате анализа паттернов метилирования промоторов генов *TaMyc-A1*, *F3H* и *CHI* мягкой пшеницы было показано, что особенности метилирования данных областей не вносят существенного вклада в тканеспецифичный характер регуляции экспрессии изученных генов биосинтеза флавоноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов включает в себя широкий спектр механизмов, используемых клеткой для изменения уровня экспрессии конкретных генов, и, как следствие, изменения количества продуктов данных генов. В настоящей работе проводились идентификация и структурный анализ генов, кодирующих факторы транскрипции *bHLH-Myc*, *R2R3-Myb* и *WD40*, потенциально вовлеченные в регуляцию генов системы биосинтеза флавоноидов у представителей родов *Hordeum*, *Triticum* и *Aegilops*, а также исследование паттернов метилирования регуляторных и структурных генов биосинтеза флавоноидов мягкой пшеницы. Полученные данные важны для понимания механизмов формирования особенностей регуляции синтеза данных соединений у аллополиплоидной пшеницы, и позволяют сделать вывод о ключевом влиянии различий в первичной структуре промоторов данных генов на характер их экспрессии.

Было установлено, что среди идентифицированных копий *bHLH-Myc* во второй и четвертой гомеологических группах хромосом пшеницы копия *TaMyc-B1*,

экспрессируясь, участвует наряду с *TaMyc1-A1* в формировании комплекса MBW, активирующего синтез в coleoptile пшеницы. Впервые идентифицирована и W-компонента (WD40-кодирующие гены) MBW-комплексов пшеницы и ячменя. Доказано, что M- и B-компонентами комплекса, активирующего синтез антоцианов в aleurone, являются, соответственно *HvMyc1-H3* и *HvMyc2*, оба локализованные в хромосоме 4HL и соответствующие известным локусам *Blx1* или *Blx3*, ранее выявленным на основе фенотипической оценки.

Данная работа расширяет существующие представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе появления антоциановой окраски различных органов ячменя и пшеницы, и позволяет наметить направления будущих фундаментальных исследований. Кроме того, сведения об отличиях аллельных вариантов изученных регуляторных генов уже используются в развивающемся направлении работ по ускоренному получению ячменя с повышенной диетической ценностью на основе маркер-контролируемого отбора и направленного мутагенеза (при помощи геномного редактирования).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации по теме работы в рецензируемых журналах:

1. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. MYC gene family in cereals: Transformations during evolution of hexaploid bread wheat and its relatives //Molecular Biology. – 2017. – Т. 51. – №. 5. – С. 674-680. DOI:10.1134/S0026893317050181.
2. **Strygina K.V.**, Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone //BMC plant biology. – 2017. – Т. 17. – №. S1 (184). DOI:10.1186/s12870-017-1122-3.
3. Шоева О.Ю., **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – №. 3. – С. 333-342. DOI:10.18699/VJ18.369.

Публикации в материалах научных конференций:

1. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Семейство генов MYC злаковых растений: преобразования в ходе эволюции родов *Triticum* и *Aegilops* //Биология - наука 21го века: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 18-22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. – 2016. – С. 153.
2. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. MYC gene family in cereals: transformation in the course of the *Triticum* and *Aegilops* genera evolution // The Eighth International Young Scientists School “Systems Biology and Bioinformatics” – SBB-2016 (Novosibirsk, 22-25 August, 2016). Abstracts. – 2016 – С. 73.
3. **Strygina K.V.**, Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Copies of the *TaMyc1* gene determining anthocyanin pigmentation of wheat grain: identification and analysis of the

evolutionary features //The I International Workshop “Plant Genetics and Genomics For Food Security” (Novosibirsk, 26-28 August, 2016). Abstracts. – 2016. – С. 58.

4. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. MYC gene family in cereals: transformation in the course of the Triticum and Aegilops genera evolution //The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology – BGRS\SB-2016 (Novosibirsk, 29 August – 2 September, 2016). Abstracts. – 2016. – С. 298.

5. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Идентификация генов биосинтеза антоцианов в зерновке ячменя, и разработка диагностических маркеров для этих генов //III международная конференция «генофонд и селекция растений», посвященная 130-летию Н.И. Вавилова (Новосибирск, 28-30 марта, 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 66.

6. **Strygina K.V.**, Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. Duplicated genes in polyploid plant species - case studies in wheat and potato //4-ая международная научная конференция "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" (PlantGen2017) (Казахстан, Алматы, 29 мая – 2 июня 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 116.

7. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. Identification and analysis of the MYC gene family in Triticeae //Systems Biology and Bioinformatics: the Ninth International Young Scientists School SBB-2017 (Yalta, Russia, 25-30 June, 2017). Abstracts. – 2017. – С. 63.

8. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Идентификация и анализ генов семейства MYC Пшеницевых //Беляевские чтения: Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева (Новосибирск, 7–10 августа 2017 г.). Сборник тезисов. – 2017. – С. 211.

9. **Стрыгина К.В.** Регуляторные гены биосинтеза антоцианов в зерновке ячменя *Hordeum vulgare* L. //Конференция «Ломоносов 2018» (Москва, 9-13 апреля 2018 г.). Сборник тезисов. – 2018.

10. **Стрыгина К.В.**, Хлесткина Е.К. Гены-регуляторы антоциановой окраски зерновки ячменя //IV международная конференция «Генофонд и селекция растений» (Новосибирск, 4–6 апреля 2018 г.). Сборник тезисов. – 2018. – С. 338.

11. **Strygina K.V.**, Börner A., Khlestkina E.K. Transcriptional regulators of flavonoid biosynthesis: MYB, bHLH and WD40 gene families in Triticeae //17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference (Bucharest, Romania, 3-8 June 2018). Abstracts. – 2018. – С. 22.

12. **Strygina K.V.**, Khlestkina E.K. Regulatory genes of anthocyanins biosynthesis in the barley grain //The 11th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2018 (Novosibirsk, 20-25 August 2018). Abstracts. – 2018. – С. 188.