

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *F3h* В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ ПШЕНИЦЫ

© 2013 г. О. Ю. Шоева*, Е. К. Хлесткина

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 20.03.2013

Принята к печати 19.05.2013

Ген *F3h* кодирует у растений один из ключевых ферментов биосинтеза флавоноидных соединений — флаванон-3-гидроксилазу. У большинства видов имеется одна копия этого гена, тогда как в геноме мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, геном ВВААDD) найдено четыре копии. При изучении транскрипции копий гена *F3h* в различных органах у разных генотипов пшеницы методом ОТ-ПЦР показано, что три гомеологичных гена (*F3h-A1*, *F3h-B1*, *F3h-D1*) имеют сходные паттерны экспрессии и специфично транскрибируются только в окрашенных антоцианами перикарпе зерновки, стебле, coleoptile и листе, а паралогичная копия *F3h-B2* в геноме В — только в корнях пшеницы, где она, вероятно, участвует в биосинтезе бесцветных флавоноидных соединений, не связанных с биосинтезом антоцианов.

Ключевые слова: ген *F3h*, экспрессия, дупликация генов, функциональная специализация генов, флаванон-3-гидроксилаза, биосинтез флавоноидов, *Triticum aestivum* L.

EXPRESSION OF THE *F3h* GENE IN VARIOUS WHEAT ORGANS, O. Y. Shoeva*, E. K. Khlestkina (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: olesya_ter@bionet.nsc.ru). In plants, the *F3h* gene encodes a key enzyme of flavonoid biosynthesis pathway, flavanone 3-hydroxylase. In most plant species, *F3h* is a single-copy gene, whereas in the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, BBAADD), four copies of this gene were found. Using RT-PCR, transcription of these copies was studied in various organs of several wheat genotypes. Three homoeologous copies (*F3h-A1*, *F3h-B1*, *F3h-D1*) manifested similar expression patterns and were specifically transcribed in caryopsis pericarp, culm, coleoptile and leaf colored with anthocyanins. The paralogous copy *F3h-B2* in the B-genome was expressed only in wheat roots and probably is involved in biosynthesis of some uncolored flavonoid compounds unrelated to anthocyanin biosynthesis.

Keywords: *F3h* gene, gene duplication, functional specialization, flavanone 3-hydroxylase, flavonoid biosynthesis, *Triticum aestivum* L.

DOI: 10.7868/S0026898413060141

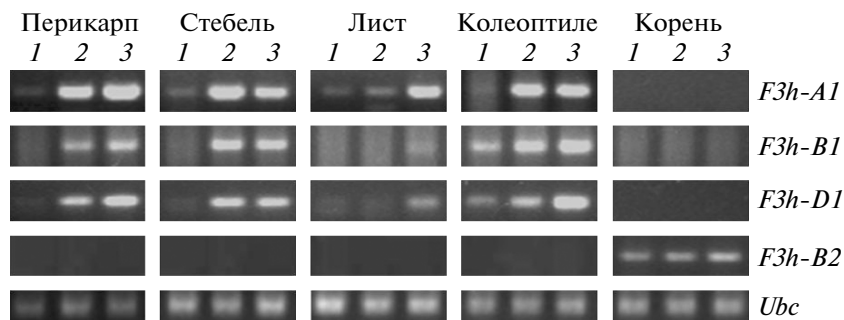
Флавоноидные соединения — постоянные компоненты растительных тканей. Они участвуют в процессах дыхания и онтогенеза, играют важную роль в окислительно-восстановительных и защитных реакциях, влияют на проницаемость мембран, являются субстратами ряда ферментов [1].

Огромное разнообразие флавоноидов (свыше 6500 соединений) возникает при участии более двадцати ферментов, которые на первом этапе синтезируют халконы, а затем дают начало различным классам флавоноидных соединений и их различным представителям внутри каждого класса [2]. Один из ключевых ферментов биосинтеза флавоноидов — флаванон-3-гидроксилаза (F3H; К.Ф. 1.14.11.9), которая, катализируя превращение флаванонов в дигидрофлавонолы, участвует в

биосинтезе пяти из двенадцати основных классов флавоноидных соединений [2, 3].

В геноме большинства видов растений имеется одна копия гена, кодирующего флаванон-3-гидроксилазу [4]. Однако на ранних стадиях эволюции злаковых растений у общего предка трибы Triticeae возник паралог гена *F3h*, который затем у большинства видов данной группы подвергся псевдогенизации. До настоящего времени паралог гена *F3h* сохранился у ржи посевной (*Secale cereale* L., $2n = 2x = 14$, геном RR), в геномах В и G полиплоидных видов пшеницы и у предка геномов В и G эгилопса спельтоидовидного (*Aegilops speltoides* Tausch., $2n = 2x = 14$, SS) [4]. Таким образом, в аллогексаплоидном геноме пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, BBAADD) имеются четыре копии гена *F3h* [5]: три гомеолога

* e-mail: olesya_ter@bionet.nsc.ru



ОТ-ПЦР с использованием праймеров к генам *F3h-A1*, *F3h-B1*, *F3h-D1*, *F3h-B2* и *Ubc* РНК, выделенной из различных органов пшеницы. 1 – линия Саратовская 29; 2 – линия i:S29Pp1Pp2^{PF}; 3 – линия S29Pp1Pp3^P.

(ортолога) в геномах А, В и D (*F3h-A1*, *F3h-B1*, *F3h-D1*) и один паралог (*F3h-B2*) в геноме В. Последний локализуется на расстоянии около 40 сМ от гена *F3h-B1* [6] и, вероятно, является результатом дупликации небольшого сегмента хромосомы 2В [4].

Поддержание в эволюции дублированных копий одного и того же гена может быть связано с их функциональной специализацией. Для того, чтобы понять имеет ли место такая специализация копий гена *F3h* пшеницы и каковы различия между дублированными генами, в настоящей работе исследовали особенности транскрипции четырех копий гена *F3h* в различных органах пшеницы у генотипов, отличающихся содержанием флавоноидных пигментов антоцианов.

Изучали транскрипцию генов *F3h* у трех генотипов пшеницы: у сорта Саратовская 29 (С29), имеющего неокрашенный перикарп и слабую антоциановую окраску стебля, coleoptile и листьев, а также у почти изогенных линий данного сорта (i:S29Pp1Pp2^{PF} и i:S29Pp1Pp3^P [7]), которые отличаются от С29 по интенсивной антоциановой пигментации coleoptile, стебля и перикарпа, а также по более высокому, по сравнению с С29, содержанию антоцианов в листьях. Условия выращивания растений, выделение суммарной РНК и синтез кДНК описаны ранее [8]. Образцы РНК из пшеницы трех генотипов выделяли одновременно из вегетативных органов и перикарпа в момент появления пигментации соответствующего органа, а из корней – на пятый день после прорастания зерновки. Для ПЦР на основе препаратов кДНК (в двух повторностях) использовали праймеры к генам *F3h-A1*, *F3h-B1*, *F3h-D1* и *F3h-B2* [5]. Эндогенным контролем служил ген *Ubc* [9]. Соответствие транскрибируемых фрагментов различным копиям гена *F3h* (DQ233636, EF463100, EU402957, EU402958) подтверждали путем секвенирования полученных ПЦР-продуктов [4].

На рисунке показан результат ОТ-ПЦР с использованием праймеров для каждой из индивидуальных копий гена *F3h*. Гомеологичные гены *F3h-A1*, *F3h-B1* и *F3h-D1* транскрибировались во всех окрашенных антоцианами органах, но не в корнях, антоцианов не содержащих. При этом каждая из копий транскрибируется более активно в интенсивно окрашенных линиях (i:S29Pp1Pp2^{PF} и i:S29Pp1Pp3^P) по сравнению со слабо окрашенной С29, за исключением листьев, по которым С29 и i:S29Pp1Pp2^{PF} не различаются (рисунок). Напротив, паралогичная копия *F3h-B2* транскрибируется в корнях, но не в перикарпе, стебле, листьях и coleoptile (рисунок). Таким образом, у пшеницы транскрипционная активность гомеологичных генов *F3h-1* связана с биосинтезом флавоноидных пигментов антоцианов в различных органах растения, тогда как ген *F3h-B2* специфически экспрессируется в неокрашенных корнях. Ранее транскрипцию паралогичной копии *F3h-2* наблюдали также в корнях ржи [4]. Кроме того, в базе данных экспрессирующихся последовательностей пшеницы [10] опубликованы нуклеотидные последовательности, которые соответствуют *F3h-B2*.

Тот факт, что картина транскрипции гомеологичных копий *F3h-A1*, *F3h-B1* и *F3h-D1* сходна и отличается от картины транскрипции *F3h-B2*, соответствует опубликованным данным о структуре промоторов этих генов [4, 11]. Нуклеотидные последовательности регуляторной области генов *F3h-A1*, *F3h-B1* и *F3h-D1* очень сходны [11], тогда как промотор гена *F3h-B2* существенно от них отличается [4].

Представление о возможном участии *F3h-1* и *F3h-B2* в разных путях биосинтеза флавоноидов согласуется с тем фактом, что имеются структурные отличия между предсказанными аминокислотными последовательностями *F3H-1* и *F3H-B2*, а именно – по заменам в некоторых субстрат-специфических сайтах [4]. Известно, что в разных путях биосинтеза флавоноидов на этапе превраще-

ния флаванонов в дигидрофлавонолы используются разные субстраты (разные соединения из класса флаванонов) [12].

Возможно, ген *F3h-2*, специфически экспрессирующийся в корнях пшеницы и ржи, функционально отличается от генов *F3h-1*, однако его биологическое значение остается пока неясным.

Авторы выражают благодарность Генераловой Галине Владимировне (ИЦиТ СО РАН) за помощь в работе.

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-33027_мол-а-вед), Президиума РАН (грант № 6.24 по программе “Молекулярная и клеточная биология”) и гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук (МД-2615.2013.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peer W.A., Murphy A.S. 2006. Flavonoids as signal molecules. In: *The Science of Flavonoids*. Ed. E. Grotewold. N.Y.: Springer Science+Business Media, pp. 239–268.
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485–493.
- Запрометов М.Н. 1974. *Основы биохимии фенольных соединений*. М.: Высшая школа.
- Khlestkina E.K., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A. 2013. Diversification of the duplicated *F3h* genes in Triticeae. *J. Mol. Evol.* **76**, 261–266.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. 2008. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome a case study in bread wheat. *BMC Plant Biol.* **8**, 88.
- Khlestkina E., Salina E., Matthies I., Leonova I., Börner A., Röder M. 2011. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley. *Euphytica.* **179**, 333–341.
- Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. 1998. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar ‘Saratovskaya 29’. *Cereal Res. Commun.* **26**, 39–46.
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S., Börner A., Khlestkina E.K. 2012. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Res. Commun.* **40**, 334–341.
- Himi E., Nisar A., Noda K. 2005. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome.* **48**, 747–754.
- The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Himi E., Maekawa M., Noda K. 2011. Differential expression of three flavanone 3-hydroxylase (F3H) genes in grains and coleoptiles of wheat. *Int. J. Plant Genomics*. ID: 369460. doi: 10.1155/2011/369460.
- Flavonoid biosynthesis pathway: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00941.html>.