

Оценка экспрессии генов PAL, C4H и FLS2 в растениях *Fagopyrum esculentum* Moench

Фисенко П.П., к.б.н., и.о. зав. лабораторией селекционно-генетических исследований полевых культур,
Клыков А.Г.*, д.б.н., зав. отделом селекции и биотехнологии сельскохозяйственных культур,
Боровая С.А., н.с. лаборатории селекционно-генетических исследований полевых культур
ФГБНУ «Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки».
*e-mail: alex.klykov@mail.ru

Флавоноиды синтезируются многими сельскохозяйственными культурами, включая гречиху посевную (*Fagopyrum esculentum* Moench), которая является перспективным источником рутина. В исследовании проведена оценка экспрессии генов PAL, C4H и FLS2, участвующих в синтезе рутина в растениях гречихи с разной окраской стеблей (красной, красно-зеленой, зелено-красной и зеленой). В результате установлены различные уровни экспрессии генов для исследуемых групп растений.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum*, экспрессия генов, флавоноиды, рутин, окраска растений.

Assessment of PAL, C4H AND FLS2 gene expression in *Fagopyrum esculentum* Moench plants

P.P. Fisenko, Ph.D. of Biological Sciences, acting head of the laboratory of selective genetic research of field crops,
A.G. Klykov, Dr. of Biological Sciences, head of the department of selection and biotechnology of agricultural crops,
S.A. Borovaya, researcher of the laboratory of selective genetic research of field crops.
Federal Research Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaiki

Flavonoids are synthesised by many agricultural crops including common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), which is a high-potential source of rutin. In reacerch an assessment of the expression of PAL, C4H and FLS2 genes, participating in rutin synthesis, was conducted in buckwheat plants with various colouration of stems (red, red-green, green-red and green). As the result, different levels of gene expression were determined in the exemined phenotypic groups.

Key words: *Fagopyrum esculentum*, expression of genes, flavonoids, rutin,

В настоящее время улучшение существующих сортов *Fagopyrum esculentum* Moench и создание новых с высоким содержанием флавоноидов в плодах и растениях с целью получения ценных продуктов питания и лекарственного сырья для фармацевтической промышленности является приоритетным направлением в селекции [1]. Известно, что антоциановая (красная) окраска стеблей является диагностическим признаком в селекции гречихи на высокое содержание рутина в надземной массе [2].

Исследование генов 11 ферментов, отвечающих за биосинтез флавоноидов: фенилаланинаминлазы (PAL), циннамат-4-гидроксилазы (C4H), 4-кумарат-CoA лигазы (4CL) 1 и 2, халконсинтазы (CHS), халконизомеразы (CHI), флаванон-3-гидроксилазы (F3H), флавоноид-3-гидроксилазы (F3OH), флавонолсинтазы (FLS) 1 и 2, и антоцианидинсинтазы (ANS), с использованием ПЦР в реальном времени проведены Xiaohua Li и др. [3]. Ими выявлено, что данные гены наиболее активны в стеблях и корнях.

В работе N. Gupta и др. [4] оценка экспрессии генов флавоноидного пути с использованием qRT-PCR на разных стадиях роста показала дифференциальную экспрессию для четырех генов: PAL, CHS, CHI и FLS, причем количество транскриптов было относительно выше у *F. tataricum* по сравнению с *F. esculentum*. Экспрессия PAL была самой высокой в стадиях проростков и полного созревания семян.

Цель работы – оценить экспрессию генов, участвующих в синтезе рутина в растениях *F. esculentum* с разной окраской стеблей.

Материалы и методика исследований. Материалом для оценки экспрессии генов, участвующих в синтезе рутина, служили растения гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) сорта При 7, собранные в полевых условиях в фазу плодообразования и разделенные на 4 группы по окраске стебля – красные, красно-зеленые, зелено-красные и зеленые.

Оценка экспрессии генов. Для исследования были выбраны гены, участвующие на разных этапах в синтезе флавоноидов – PAL, C4H и FLS2. РНК выделяли по I. Bekesiova и др. [5]. Концентрацию РНК определяли с помощью флуориметра MaxLife, качество РНК – с помощью флуориметра Qubit. Для работы взяты образцы с содержанием структурированной РНК не менее 70 %. Обратной транскриптазная реакция проводилась с помощью набора реактивов MMLV (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей) RT kit (Евроген) в 20 мкл реакционной смеси, в реакции использовали по 500 нг. тотальной РНК каждого образца. ПЦР проводили в 10 мкл реакционной смеси с применением наборов БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2×) (Биолабмикс) и qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген) по L. Xiaohua и др. [2] в амплификаторе QuantStudio 5 (ThermoScientific) в трехкратной повтор-

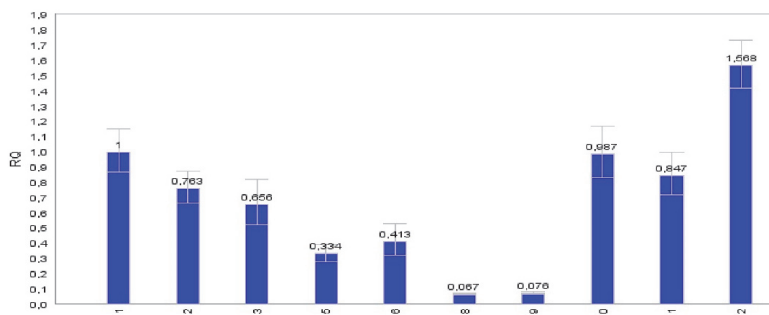
ности. В качестве референсного гена использовали гистон H3. Для построения калибровочных кривых готовили суммарную смесь всех исследуемых образцов в шести разведениях – от трехкратно превосходящей образцы до 0 с разведением в два раза на каждом шаге. Анализ экспрессии осуществлялся с помощью алгоритма анализа относительной стандартной кривой.

Результаты и обсуждение. Первый этап работы был посвящен подбору условий и оптимизации проведения ПЦР. Выравниванием праймеров на последовательностях кДНК из базы данных Gen bank были определены длины специфических продуктов реакции: H3 – 157 п.н., PAL – 187 п.н., C4H – 174 п.н., FLS2 – 193 п.н.

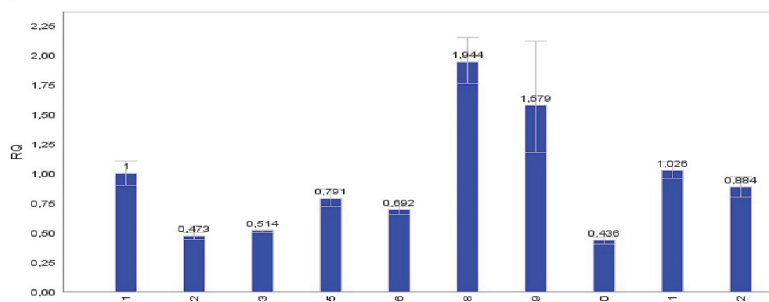
На втором этапе проведена оценка экспрессии исследуемых генов у групп растений гречихи, выделенных по цвету стебля – красные, красно-зеленые, зелено-красные и зеленые. Проведенными ранее исследованиями установлено, что красностебельные растения содержат повышенное содержание рутина в надземной массе [1].

Наибольшие уровни экспрессии генов PAL и C4H обнаружены у зелено-красных растений, тогда как экспрессия FLS2 у них минимальна (рис). Наименьшие значения экспрессии гена PAL отмечены у группы красных растений, несколько большие – у зеленой и красно-зеленой групп. Ген C4H имел значительные колебания экспрессии у отдельных растений и близкие значения у растений красной, красно-зеленой и зеленой групп. Для гена FLS2 наибольшая экспрессия выявлена у группы зеленых растений, далее по нисходящей – у красной и красно-зеленой. Гены PAL и C4H действуют на ранних этапах биосинтеза, тогда как FLS2 на этапе синтеза предшественника рутина – кверцетина. Так, нами обнаружены низкие значения экспрессии гена PAL у красных, красно-зеленых и зеленых образцов, похожая ситуация наблюдается и для гена C4H, но общий уровень экспрессии у него выше.

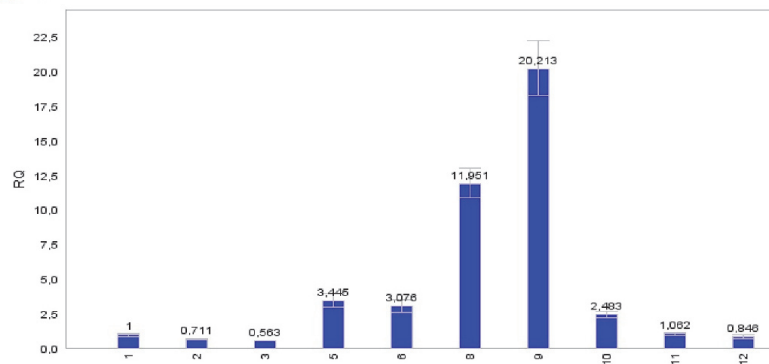
Это может свидетельствовать о том, что накопление продуктов работы этих генов произошло на более ранних этапах развития растений из красной и красно-зеленой групп, а экспрессия гена FLS2 говорит об усилении процессов биосинтеза кверцетина на момент сбора растений для анализа. Характер экспрессии исследуемых генов у зелено-красной группы может свидетельствовать об активном накоплении метаболитов на более ранних стадиях биосинтеза флавоноидов. Интересен тот факт, что для зеленых растений мы наблюдаем аналогичные результаты, как у красной и красно-зеленой групп. Можно предположить, что не всегда окраска органов растения связана с накоплением рутина. Она может быть обусловлена антоцианами, предшественником которых также является кверцетин, но биосинтез идет альтернативным путем с участием генов DFR (дигидрофлавонол-4-редуктазы) и ANS (антоцианидинсинтазы).



А ■ FLS2



Б ■ C4H



В ■ PAL

Рисунок. Оценка экспрессии гена FLS2 (А), C4H (Б) и PAL (В) у образцов гречихи сорта При 7 в зависимости от окраски стебля. 1-3 – красные; 5, 6 – красно-зеленые; 8, 9 – зелено-красные; 10-12 – зеленые.

В целом, необходимы дальнейшие исследования с участием сортов, окраска которых генетически детерминирована. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию механизмов адаптаций у гречихи и могут быть использованы для создания высокорутинных сортов.

Благодарности: работа выполнена в рамках комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» на 2018–2020 гг. проект № 18-5-025.

Список литературы

1. Клыков, А.Г. Биологические ресурсы видов рода *Fagopyrum* Mill. (Гречиха) на российском Дальнем Востоке // А.Г. Клыков, Л.М. Моисеенко, П.Г. Горовой. – Владивосток. – 2018 – 360 с.
2. Пат. 2255466 RU: МПК⁷ А 01 Н 1/04. Способ отбора растений гречихи с высоким содержанием рутина в надземной массе / А.Г. Клыков, Л.М. Моисеенко; патентообладатель ГНУ Приморский НИИСХ Россельхозакадемии. – № 2003108308; заявл. 25.03.2003 ; опубл. 10.07.2005. Бюл. № 19.
3. Xiaohua Li, Nam Li Park, Hui Xu, Sun-Hee Woo, Cheol Ho Park, Sang Un Park. Differential expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of phenolic compounds in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) // J. Agric. Food Chem. – 2010. – № 58. – P. 12176–12181.
4. Gupta N., Sharma S.K., Rana J.C., Chauhan R.S. Expression of flavonoid biosynthesis genes vis-à-vis rutin content variation in different growth stages of *Fagopyrum* specie // J. Plant Physiol. – 2011. – № 168 (17). DOI: 10.1016/j.jplph.2011.06.018.
5. Bekesiova I. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the Carnivorous plant *Drosera rotundifolia* / I. Bekesiova, J.-P. Nap, L. Mlynarova // Plant Molecular Biology Reporter. – 1999. – Vol. 17. – P. 269–277.

DOI 10.18699/GPB2020-120

Генетические ресурсы пшеницы и ячменя для создания сортов, адаптивных к комплексу стресс-факторов степных зон Казахстана

Цыганков В.И.^{*1,2}, к.с.-х.н., зав. отделом селекции, Цыганкова М.Ю.¹, зав. лаб. генофонда растений, Шанинов Т.С.¹, с.н.с., Цыганкова Н.В.³, к.с.-х.н., с.н.с., Цыганков А.В.¹, м.н.с., Розман Е.С.¹, и.о. м.н.с.,

¹ТОО «Актюбинская сельскохозяйственная опытная станция», Актюбе, Республика Казахстан;

²ФГБНУ «ФНЦ биосистем и агротехнологий РАН», Оренбург, Россия;

³ФГБНУ «ФИЦ «Немчиновка» РАН», Московская обл., Россия.

*e-mail: zigan60@mail.ru

Жесткие условия степных и сухостепных зон Казахстана требуют создания новых адаптивных сортов двух стратегических культур – яровой