

Восстановление функции гена *HvMyc2*, контролирующего голубую окраску зерна ячменя, путем его направленной модификации

Зыкова Т.^{1, 2*}, Егорова А.^{1, 2, 3}, Шоева О.^{1, 2, 3}, Хертиг К.⁴, Коэппель И.⁴, Хикель Ш.⁴, Короткова А.^{2, 3}, Кумлен Й.⁴, Герасимова С.^{2, 3}, Хлесткина Е.^{1, 2, 3}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур им. Лейбница, Гатерслебен, Германия

* t.zykova@g.nsu.ru

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*; антоцианы; алевроновый слой; повышение пищевой ценности

Мотивация и цель: В настоящее время актуальны исследования генетической основы метаболических реакций культурных растений, связанных с образованием биоактивных соединений с антиоксидантными свойствами – флавоноидов, и в том числе антоцианов. Положительное влияние данных биоактивных веществ на липидный обмен и защиту от окислительного стресса у модельных животных и человека приводит к снижению риска развития ряда заболеваний [1]. У злаков образование антоциановых пигментов происходит в различных слоях оболочки зерновок. Так, алевроновый слой, прилежащий к тканям эндосперма, может накапливать антоциан дельфинидин, в результате чего зерно ячменя (*Hordeum vulgare* L.) приобретает голубой оттенок.

Биосинтез флавоноидов является результатом работы структурных генов, кодирующих ферменты, и регуляторных генов, кодирующих, например, транскрипционные факторы. Существуют данные о функциях и последовательностях структурных генов биосинтеза антоцианов, но для полного описания механизма его контроля необходимо выяснить роль регуляторных факторов. Это позволит создавать растения с зернами, имеющими повышенное содержание антоцианов.

Ранее было показано, что ген *HvMyc2* кодирует транскрипционный фактор, активирующий работу генов ферментов биосинтеза антоцианов в алевроновом слое зерен ячменя [2]. Была также обнаружена корреляция между фенотипом неокрашенных зерен ячменя и однонуклеотидной инсерцией в данном гене, вызывающей сдвиг рамки считывания с образованием раннего стоп-кодона.

Целью работы стало уточнение функции гена *HvMyc2* в регуляции биосинтеза антоцианов зерновок ячменя путем восстановления рамки считывания данного гена в неокрашенном сорте посредством внесения в целевой участок небольших делеций при помощи РНК-направленной эндонуклеазы Cas9.

Методы и алгоритмы: Мутантные растения были получены в результате агробактериальной трансформации незрелых зародышей сорта Golden Promise, имеющего неокрашенные зерновки. Затем после последовательных

самоопылений в теплице получали поколения T1–T5. Путем генотипирования поколений T0–T4 с помощью глубокого секвенирования и метода Сэнгера были отобраны гомозиготные мутантные линии. Дополнительно было проведено тестирование на наличие вставок трансгена Cas9. Анализ фенотипа зерен полученных линий был проведен с помощью световой микроскопии, биохимического определения антоцианов [3] и определения уровня экспрессии генов ферментов биосинтеза данных соединений.

Световая микроскопия была использована для визуальной оценки количества антоциановых пигментов в алейроновом слое отдельных зерен по четырехбалльной шкале. Для этого с растения собирали три колоса, из каждого выбирали по 10 зерен. В результате было проанализировано 30 зерен с растения и по 90 зерен каждого генотипа.

Оценка экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов флаванон-3-гидроксилазы (*F3h*), флавоноид-3'-гидроксилазы (*F3'h*), флавоноид-3',5'-гидроксилазы (*F3'5'h*) и антоцианидинсинтазы (*Ans*) была проведена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с красителем SYBR (Applied Biosystems, США). В качестве референсных использовали гены *Actin* и *Mdh*, кодирующие актин и малатдегидрогеназу соответственно. Результаты расчетов были проанализированы с помощью теста Краскела–Уоллиса и последующих попарных сравнений Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественное тестирование (Past, версия 4.03).

Результаты: Были созданы две конструкции, включающие ген Cas9 и направляющую РНК к одному из двух целевых участков в кодирующей части гена *HvMyc2*. После тестирования активности конструкций на протопластах ячменя была проведена агробактериальная трансформация незрелых зародышей сорта ячменя Golden Promise. Среди полученных растений поколения T0 49 содержали мутации в целевом гене, для дальнейшего отбора в поколениях T1–T4 выбрали восемь растений. В поколении T4 две линии имели *HvMyc2* дикого типа, две другие – содержали делецию 4 п. н. в первом или втором целевом сайте, одна – делецию 11 п. н., а другие четыре – делецию 1 п. н.

В линиях с делециями 1 и 4 п. н. функция целевого гена была восстановлена, в результате чего произошла активация биосинтеза антоцианов в алейроновом слое зерновки. Накопление целевых соединений в зерне было подтверждено с помощью световой стереомикроскопии и количественного определения содержания антоцианов. Анализ экспрессии генов биосинтеза антоцианов показал, что восстановление работы гена *HvMyc2* приводит к увеличению уровня транскриптов структурных генов, вовлеченных в общие для всех антоцианов реакции.

Выводы: Таким образом, данное исследование продемонстрировало возможность использования технологии генного редактирования для улучшения питательной ценности зерен ячменя путем увеличения содержания антоцианов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ (№ 21-66-00012).

Restoring the function of the *HvMyc2* gene, which controls the blue color of barley grain, through its targeted modification

Zykova T.^{1,2*}, Egorova A.^{1,2,3}, Shoeva O.^{1,2,3}, Hertig K.⁴, Koeppel I.⁴, Hikel S.⁴, Korotkova A.^{2,3}, Kumlehn J.⁴, Gerasimova S.^{2,3}, Khlestkina E.^{1,2,3}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany

* t.zykova@g.nsu.ru

Key words: *Hordeum vulgare*; anthocyanins; aleurone layer; increase in nutritional value

Motivation and Aim: Currently, research into the genetic basis of metabolic reactions of cultivated plants associated with the formation of bioactive compounds with antioxidant properties – flavonoids, including anthocyanins – is relevant. The positive effect of these bioactive substances on lipid metabolism and protection from oxidative stress in model animals and humans leads to a reduction in the risk of developing a number of diseases [1]. In cereals, the formation of anthocyanin pigments occurs in various layers of the grain hull. Consequently, the aleurone layer in close proximity to the endosperm tissues can accumulate the anthocyanin delphinidin, thereby imparting a blue hue to barley grains (*Hordeum vulgare* L.).

The biosynthesis of flavonoids is the result of the combined action of structural enzyme genes and regulatory genes, which encode, for instance, transcription factors. There is data on the functions and sequences of structural genes for anthocyanin biosynthesis, but to fully describe the mechanism of its control, it is necessary to clarify the role of regulatory factors. This will enable the creation of plants with grains that have a high content of anthocyanins.

It was previously shown that the *HvMyc2* gene encodes a transcription factor that activates the genes for anthocyanin biosynthesis enzymes in the aleurone layer of barley grains [2]. A correlation was also identified between the phenotype of uncolored barley grains and a single nucleotide insertion in this gene, which resulted in a frameshift and the formation of an early stop codon.

The objective of this study was to elucidate the function of the *HvMyc2* gene in the regulation of anthocyanin biosynthesis in barley grains by restoring the reading frame of this gene in an uncolored variety through the introduction of small deletions into the target region using RNA-directed endonuclease Cas9.

Methods and Algorithms: The mutant plants were obtained as a result of agrobacterial transformation of immature embryos of the Golden Promise variety, which has uncolored grains. Subsequently, following a series of self-pollinations conducted within a greenhouse setting, five generations (T1–T5) were generated. Genotyping of generations T0–T4 was conducted using deep sequencing and the Sanger method, with the aim of identifying lines homozygous for mutations. Additionally, testing was performed to detect the presence of Cas9 transgene insertions. The phenotype of the grains of the obtained lines was analyzed using light microscopy, biochemical determination of anthocyanins [3], and assessment of the level of expression of structural genes of the biosynthesis of these compounds.

Light microscopy was employed to assess the quantity of anthocyanin aggregates in the aleurone layer of individual grains on a four-point scale. To this end, three spikes were harvested from the plant, and 10 grains were selected from each spike. Consequently, 30 grains per plant and 90 grains of each genotype were subjected to analysis.

The expression of the structural genes of anthocyanin biosynthesis, namely flavanone 3-hydroxylase (*F3h*), flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'h*), flavonoid 3',5'-hydroxylase

(*F3'5'h*) and anthocyanidin synthase (*Ans*), was evaluated using real-time polymerase chain reaction with SYBR dye (Applied Biosystems, USA). The *Actin* and *Mdh* genes, which encode actin and malate dehydrogenase, respectively, were employed as reference genes. The results of the calculations were subjected to analysis using the Kruskal–Wallis test and subsequent pairwise Mann–Whitney comparisons with Bonferroni correction for multiple testing (Past, version 4.03).

Results: Two constructs were designed, including the Cas9 gene and a guide RNA to one of two target regions in the coding part of the *HvMyc2* gene. Following the assessment of construct activity in barley protoplasts, agrobacterial transformation of immature embryos of the barley variety Golden Promise was conducted. Among the plants of the T0 generation, 49 exhibited mutations in the target gene. Eight of these plants were selected for further selection in the T1–T4 generations. In the T4 generation, two lines exhibited wild-type *HvMyc2*, while the other two displayed a 4 bp deletion at the first or second target site, one exhibited an 11 bp deletion, while the other four lines exhibited a 1 bp deletion.

In lines exhibiting deletions of 1 and 4 bp, the function of the target gene was restored, resulting in the activation of anthocyanin biosynthesis in the aleurone layer of the grain. The accumulation of target compounds in the grain was confirmed using light microscopy and quantification of anthocyanin content. The expression of anthocyanin biosynthesis genes was analyzed, and it was found that the restoration of the *HvMyc2* gene resulted in an increase in the level of transcripts of structural genes involved in reactions that are common to all anthocyanins.

Conclusion: This study demonstrated the feasibility of using gene editing technology to enhance the nutritional value of barley grains by increasing the anthocyanin content.

Funding: The study is supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 21-66-00012).

Список литературы/References

1. Lin B.W. et al. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1226-1243
2. Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. *BMC Plant Biol*. 2017;17(Suppl. 1):184. doi 10.1186/s12870-017-1122-3
3. Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*. 1999;76(3):350-354