

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *WD40*, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ *Triticeae*

© 2019 г. К. В. Стрыгина<sup>1,2, \*</sup>, Е. К. Хлесткина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190121 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

\*e-mail: k.strygina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 06.02.2019 г.

После доработки 20.02.2019 г.

Принята к публикации 09.04.2019 г.

Биосинтез флавоноидов у растений регулируется специфическим белковым комплексом MBW, который формируется при взаимодействии факторов транскрипции типа R2R3-Myb, bHLH и WD40. Геномы представителей трибы *Triticeae* характеризуются наличием ортологичных и гомеологичных копий регуляторных генов биосинтеза флавоноидов. Структурно-функциональная организация семейств R2R3-Myb и bHLH уже хорошо изучена, тогда как гены, кодирующие третью компоненту комплекса MBW у представителей *Triticeae* – фактор WD40 – оставались практически неисследованными. В настоящей работе был проведен поиск и анализ генов *WD40* у представителей родов *Hordeum*, *Triticum* и *Aegilops*. В результате были идентифицированы две паралогичные группы генов (*WD40-1* и *WD40-2*), располагающиеся на длинных и коротких плечах хромосом шестой группы. При этом было показано, что консервативность идентифицированных последовательностей *WD40* поддерживается отбором. Экспрессия генов *WD40-1* и *WD40-2* наблюдается на высоком уровне в различных органах и тканях пшеницы и ячменя вне зависимости от их пигментации. Предполагается, что данные гены могут участвовать в биосинтезе не только флавоноидных пигментов антоцианов, но и неокрашенных соединений.

**Ключевые слова:** *Aegilops*, *Hordeum*, MBW, *Triticeae*, *Triticum*, WD40, биосинтез флавоноидов, транскрипционный фактор.

**DOI:** 10.1134/S0016675819110158

Регуляция экспрессии генов включает широкий спектр механизмов, используемых клеткой для изменения количества мРНК, и, как следствие, изменения количества продуктов конкретных генов. Биосинтез флавоноидов и их производных антоцианов – один из самых полно охарактеризованных метаболических путей растений [1–4]. Регуляторные механизмы биосинтеза данных соединений обуславливаются взаимодействием факторов транскрипции трех типов: R2R3-Myb, basic helix-loop-helix (bHLH) и WD40, образующих вместе комплекс MBW (R2R3-Myb + bHLH + WD40) [2, 3, 5, 6]. Паттерн экспрессии и ДНК-связывающая специфичность белков R2R3-Myb и bHLH определяют множество активируемых комплексом MBW генов, в то время как белки WD40 обладают более общей ролью в данном комплексе [3, 6, 7].

Белки семейства WD40 характеризуются наличием высокосимметричных повторов WD40 (обыч-

но 4–10 у растений), состоящих приблизительно из 40 аминокислотных остатков, начинающихся, как правило, с дипептида глицин-гистидин (G-H) и оканчивающихся дипептидом триптофан-аспарат (W-D) [8–10]. Четыре и более повторов WD40 могут образовывать структуру так называемого β-пропеллера, в котором серия четырехцепочечных антипараллельных бета-листов располагается по кругу вокруг активного сайта, создавая тем самым тороидальную структуру, облегчающую белок-белковые взаимодействия [8, 10]. Например, у *Arabidopsis* идентифицировано 237 белков WD40 с более чем четырьмя повторами [8], среди которых фактор транскрипции TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) проявляет плейотропное действие как регулятор в процессах биосинтеза флавоноидов и дифференциации клеток эпидермиса [5, 6, 11].

Из представителей трибы *Triticeae* ген *HvWD40* до настоящего времени был изучен только у ячме-

ня *Hordeum vulgare* L. Была показана транскрипционная активность данного гена в окрашенных и неокрашенных тканях ячменя, и установлена идентичность аллелей данного гена у отличающихся по пигментации генотипов [12]. В настоящей работе проводилась идентификация и структурный анализ генов, кодирующих факторы транскрипции WD40, потенциально вовлеченные в регуляцию генов системы биосинтеза флавоноидов в трибе Triticeae у представителей родов *Triticum*, *Aegilops* и *Hordeum*. Полученные данные важны для понимания механизмов формирования особенностей регуляции синтеза данных соединений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Идентификация и анализ генов WD40

На основании последовательности гена *H. vulgare HvWD40* (GenBank: MF679150) с использованием BLASTN был осуществлен поиск гомологичных генов у видов трибы Triticeae в базах данных IPK Barley BLAST Server и URGI [13]. Экзон-интронная структура генов была предсказана с помощью программы FGENESH+. Аннотация функциональных доменов была осуществлена с помощью InterPro [14]. Кластерный анализ, расчет отношения  $Ka/Ks$  и расчет времени дивергенции был выполнен с MEGA v6.06; в качестве референсной последовательности использовался ген арабидопсиса *AtTTG1* (GenBank: AK227211) [15]. Построение филогенетического дерева было осуществлено методом Neighbour-joining [16] на 500 бутстрэп-репликах, на полученных изображениях показаны данные значений бутстрэпа  $\geq 50\%$ .

### Растительный материал

Растительный материал, использованный в данном исследовании, представлен в табл. 1. Для выделения ДНК и РНК из стебля, зерновки (алеяроновый слой и перикарп) и цветковой чешуи, растения были выращены в теплицах при 16-часовом световом дне при температуре 20–25°C. Для выделения ДНК и РНК из колеоптиле, растения были пророщены в климатической камере “Rubarth Apparate” (RUMED GmbH) при 12-часовом световом дне при температуре 20°C. В каждом эксперименте анализировались три биологические повторности.

### Выделение РНК, синтез кДНК

Выделение РНК из перикарпа, алеярона, цветковой чешуи и стебля проводили на стадии восковой спелости через 45–75 дней после посева. Выделение РНК из колеоптиле было проведено на четвертый день после прорастания. Тотальная РНК была выделена с использованием набо-

ра RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Полученная РНК была обработана RNase-free DNase set (QIAGEN). Одноцепочечную кДНК синтезировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.4 мг РНК-матрицы с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### Дизайн праймеров, количественная ОТ-ПЦР

Дизайн праймеров был выполнен с использованием Oligo Primer Analysis Software v. 7 [17] на основании последовательностей генов, идентифицированных в настоящей работе. Количественная ОТ-ПЦР была проведена на кДНК в реакционной смеси объемом 15 мкл при использовании набора реагентов SYBR Green I (Синтол) и системы ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). ПЦР проводили в следующих условиях: 40 циклов 15 мин при 95°C; 15 с при 94°C, 30 с при 60°C; 30 с при 72°C. Показания для построения кривых плавления продуктов ПЦР снимались в условиях: 15 с при 95°C; 15 с при 60°C; 15 с при 95°C. Графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц строились на основе трех последовательных 3-кратных разведений. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену убиквитин (*Ubiquitin*); праймеры были взяты в работе Himi et al., 2005 [18]. Каждый образец запускаялся в трех технических повторностях. Различия между генотипами были проверены с помощью теста Манна–Уитни (*U*-тест) или с помощью критерия Краскела–Уоллиса, при которых значение  $p \leq 0.05$  считалось значимым. Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Идентификация и структурная организация генов WD40 у представителей родов *Triticum*, *Aegilops* и *Hordeum*

При использовании последовательности WD40-кодирующего гена ячменя *H. vulgare* ( $2n = 2x = 14$  (НН)) *HvWD40* (GenBank: MF679150), были *in silico* идентифицированы последовательности ортологичных генов в геномах диплоидных и аллополиплоидных представителей родов *Triticum* (*T. urartu*, *T. monococcum*,  $2n = 2x = 14$  (AA); *T. durum*,  $2n = 4x = 28$  (BBAA); *T. aestivum*,  $2n = 6x = 42$  (BBAADD)) и *Aegilops* (*Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*,  $2n = 2x = 14$  (SS); *Ae. tauschii*,  $2n = 2x = 14$  (DD)). Идентифицированные последовательности были выявлены на длинных плечах в хромосомах шестой группы у всех изученных видов и обозначены как *WD40-1* (табл. 3).

Кроме того, на коротких плечах в хромосомах шестой группы были выявлены паралогичные WD40-кодирующие копии, обозначенные в дан-

**Таблица 1.** Растительный материал, использованный в данном исследовании

Вид	Сорт/каталожный номер	Орган	Цвет (антоциановая пигментация)
<i>H. vulgare</i> L.	Bowman (BW, NGB22812)	Алейроновый слой	Нет
		Перикарп	Нет
		Цветковые чешуи	Нет
		Стебли	Нет
	Intense blue aleurone (BA, NGB20651)	Алейроновый слой	Голубой
	Purple lemma and pericarp (PLP, NGB22213)	Перикарп	Фиолетовый
		Цветковые чешуи	Нет
		Стебли	Фиолетовый
	Саратовская 29	Колеоптиле	Светлый
	(Saratovskaya 29, S29, i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3)	Перикарп	Нет
<i>T. aestivum</i> L.	i:S29Ppurple	Колеоптиле	Темно-красный
	(i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>P</sup> )	Перикарп	Фиолетовый
	i:S29pp-A1(YP)	Колеоптиле	Нет
	(i:S29pp-A1Pp-D1Pp3)	Перикарп	Нет
	i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>P</sup>	Перикарп	Нет
	i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>P</sup>	Перикарп	Светлый
	i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>PF</sup>	Перикарп	Фиолетовый
	i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>PF</sup>	Перикарп	Нет
	i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3 <sup>PF</sup>	Перикарп	Светлый
	i:S29Ra	Колеоптиле	Темно-красный
	Новосибирская 67 (N67)	Колеоптиле	Темно-красный
	Chinese spring (CS)	Колеоптиле	Нет
	Chinese spring (Hope7A) (CS(H7A))	Колеоптиле	Темно-красный
	Chinese Spring (Hope 7B) (CS(H7B))	Колеоптиле	Светлый
	Purple chance	Колеоптиле	Темно-красный
	Голубка	Колеоптиле	Нет
<i>T. durum</i> L.	TRI 15744	Колеоптиле	Темно-красный

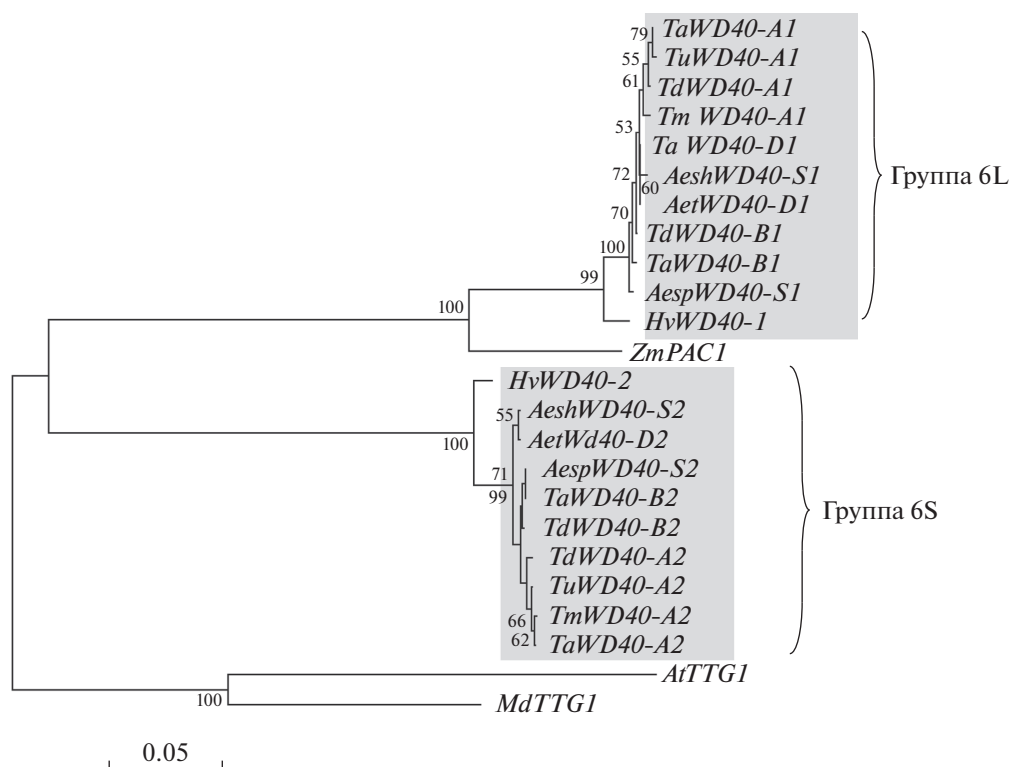
**Таблица 2.** Последовательности ПЦР-праймеров, использованных для количественной ОТ-ПЦР в настоящей работе

Ген	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	Температура отжига, °С	Длина ПЦР-продукта, пн
<i>HvWD40-1</i>	AGCACTCCACCATCGTCTA	CACTGCAGCTGGTTTATCT	60	349
<i>HvWD40-2</i>	AAGGTGGTTGTGCTTGATATTC	CAGCATTGCCATTTCCATTG	60	205
<i>TaWD40-1</i>	CACCGCAGGCTGCAAGAC	CACCCGCATCATAAACAAGAAC	60	129
<i>TaWD40-2</i>	CCTCACTCTTCTTGCCACATT	TTTCCATTGCCTCCGCTATT	60	104

Таблица 3. Регуляторные гены, аннотированные в настоящем исследовании на основании последовательности гена ячменя *HvWD40-1* (GenBank: MF679150)

Ген	Организм	Хромосома	Последовательности	Предсказанная длина кодирующей последовательности, пп/аминокислотной последовательности, а.к
<i>TaWD40-A1</i>	<i>T. aestivum</i>	6AL	IWGSC_chrf6AL_ab_k71_contigs_longerthan_200_5775988	1071/357
<i>TdWD40-A1</i>	<i>T. durum</i>	6AL	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_11137	1071/357
<i>TuWD40-A1</i>	<i>T. urartu</i>	6AL	TGAC_WGS_urartu_v1_contig_188458	1071/357
<i>TmWD40-A1</i>	<i>T. monocoecum</i>	6AL	TGAC_WGS_monocoecum_v1_contig_933243	1071/357
<i>TaWD40-B1</i>	<i>T. aestivum</i>	6BL	TA_454_ch6BL_contig02131	1071/357
<i>TdWD40-B1</i>	<i>T. durum</i>	6BL	TGAC_WGS_durum_v1_contig_204160**	1016**
<i>AespWD40-S1</i>	<i>Ae. speltoides</i>	6SL	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_1587836	1071/357
<i>AeshWD40-S1</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	6SL	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_94953**	1046**
<i>TaWD40-D1</i>	<i>T. aestivum</i>	6DL	TGACv1_scaffold_528482_6DL dna:scaffold:1:31420:1	1071/357
<i>AeiWD40-D1</i>	<i>Ae. tauschii</i>	6DL	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_144026	1071/357
<i>HvWD40-2</i>	<i>H. vulgare</i>	6HS	morex_contig_44548	1113/371
<i>TaWD40-A2</i>	<i>T. aestivum</i>	6AS	IWGSC_chrf6AS_ab_k71_contigs_longerthan_200_4360143	1113 / 371
<i>TdWD40-A2</i>	<i>T. durum</i>	6AS	TGAC_WGS_durum_v1_contig_508891*	756**
<i>TuWD40-A2</i>	<i>T. urartu</i>	6AS	TGAC_WGS_durum_v1_contig_195858*	732**
<i>TmWD40-A2</i>	<i>T. monocoecum</i>	6AS	TGAC_WGS_monocoecum_v1_contig_904541	1113/371
<i>TaWD40-B2</i>	<i>T. aestivum</i>	6BS	TGACv1_scaffold_516533_6BS dna:scaffold:1:17194:1	1107/369
<i>TdWD40-B2</i>	<i>T. durum</i>	6BS	TGAC_WGS_strongfield_v1_contig_157087	1107/369
<i>AespWD40-S2</i>	<i>Ae. speltoides</i>	6SS	TGAC_WGS_speltoides_v1_contig_479818	1107/369
<i>AeshWD40-S2</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	6SS	TSL_WGS_sharonensis_v1_contig_1092486	1113/371
<i>AeiWD40-D2</i>	<i>Ae. tauschii</i>	6DS	TGAC_WGS_tauschii_v1_contig_219841	1113/371

Примечание. Гены рода *Hordeum* были идентифицированы в базе данных IPK Barley BLAST Server, гены родов *Triticum* и *Aegilops* были идентифицированы в базе URGI. \* – контиг содержит полную последовательность гена, \*\* – неполная длина кодирующей последовательности.



**Рис. 1.** Анализ филогенетического сходства генов *WD40* (CDS). Серым фоном выделены гены 6L и 6S гомеологической группы хромосом. *AtTTG1* – AK227211, *MdTTG1* – GU173814, *ZmPAC1* – AY115485.

ном исследовании как *WD40-2* (табл. 3). Данные последовательности были обнаружены в геномах всех проанализированных видов (включая *H. vulgare*), за исключением мягкой пшеницы *T. aestivum* – в ее D-геноме ген *WD40-2* не был идентифицирован. Уровень идентичности между полными кодирующими последовательностями копий генов *WD40-1* и *WD40-2* составляет около 60%.

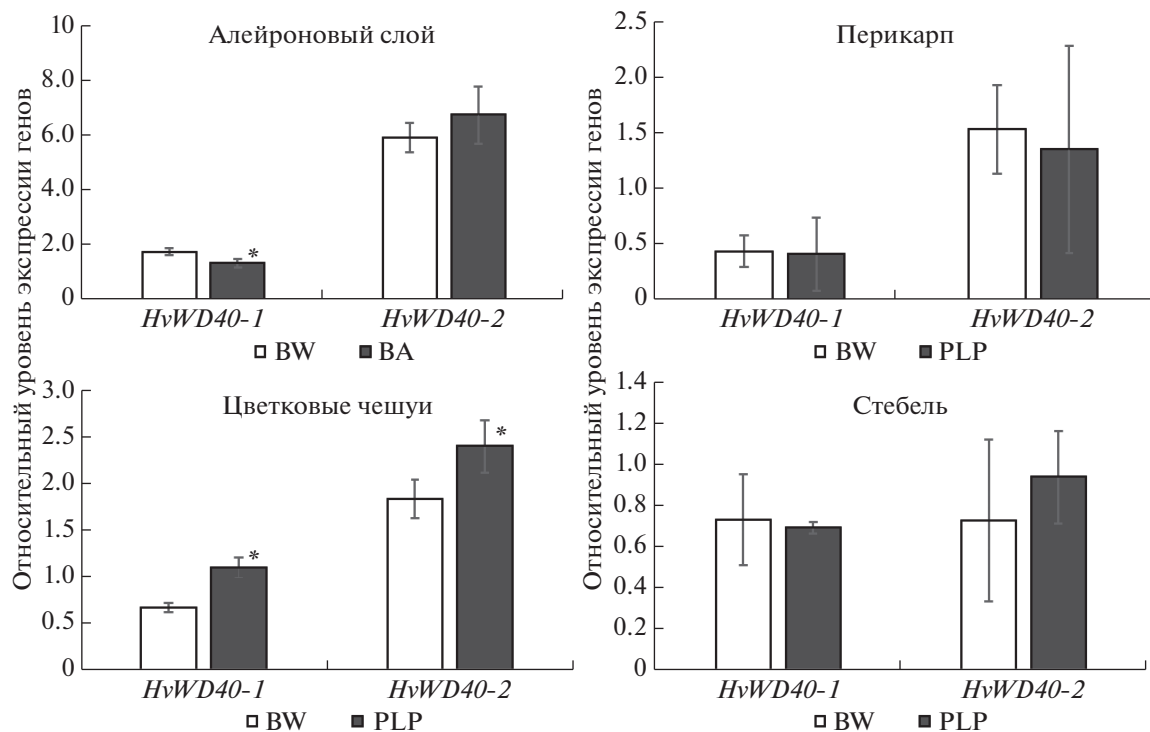
Все выявленные последовательности генов *WD40* у представителей трибы Triticeae обладают только одним экзоном, несущим специфический для данного семейства домен, содержащий *WD40*-повторы (InterPro: IPR036322). Какие-либо мутации в составе данных генов, приводящие к нарушению рамки считывания, идентифицированы не были.

#### Эволюционный анализ генов *WD40* трибы Triticeae

Для идентифицированных генов было подсчитано число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (*Ka*), число синонимичных замен на синонимичные сайты (*Ks*) и отношение *Ka/Ks*. Соотношения несинонимичных и синонимичных замен варьировались между 0.115–0.127 и 0.346–0.396 соответственно (табл. 4). Путем анализа соотношения *Ka/Ks* определили, что идентифицированные последовательности *WD40* находятся под действием стабилизирующего отбо-

**Таблица 4.** Оцененное число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (*Ka*), количество синонимичных замен на синонимичные сайты (*Ks*) и соотношение *Ka/Ks* для генов *WD40* трибы Triticeae

Ген	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka/Ks</i>
<i>HvWD40-1</i>	0.128	0.396	0.226
<i>HvWD40-2</i>	0.115	0.372	0.197
<i>TaWD40-A1</i>	0.127	0.393	0.197
<i>TaWD40-B1</i>	0.127	0.382	0.203
<i>TaWD40-D1</i>	0.127	0.382	0.201
<i>TaWD40-A2</i>	0.116	0.351	0.217
<i>TaWD40-B2</i>	0.116	0.346	0.226
<i>TdWD40-A1</i>	0.127	0.386	0.200
<i>TdWD40-B2</i>	0.116	0.344	0.237
<i>TdWD40-A2</i>	0.117	0.349	0.239
<i>TmWD40-A1</i>	0.127	0.385	0.201
<i>TuWD40-A1</i>	0.127	0.396	0.196
<i>TmWD40-A2</i>	0.116	0.354	0.209
<i>TuWD40-A2</i>	0.115	0.353	0.208
<i>AespWD40-S1</i>	0.127	0.381	0.205
<i>AetWD40-D1</i>	0.127	0.382	0.201
<i>AeshWD40-S2</i>	0.116	0.349	0.206
<i>AespWD40-S2</i>	0.116	0.346	0.226
<i>AetWd40-D2</i>	0.116	0.347	0.210



**Рис. 2.** Относительный уровень мРНК генов *HvWD40* ячменя в алейроновом слое, перикарпе, цветковых чешуях и стеблях почти изогенных линий сорта Bowman. Цвет колонки соответствует наличию антоцианового пигмента в анализируемой ткани. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась *U*-тестом. \* – различия статистически значимы между сортом Bowman и NIL при  $p \leq 0.05$ .

ра, поскольку в среднем значение  $Ka/Ks$  для *WD40* было близко к 0.21.

Филогенетический анализ проводили на основании предсказанных полных кодирующих последовательностей генов *WD40*. Было установлено, что: (1) копии, обозначенные *WD40-1*, кластеризуются с *WD40*-кодирующим геном кукурузы *Zm-PAC1*; (2) дупликация *WD40-1/WD40-2* произошла намного раньше дивергенции *Triticum* и *Hordeum* и *Zea* и *Triticum*, т.е., возможно, на ранних этапах эволюции однодольных растений (рис. 1).

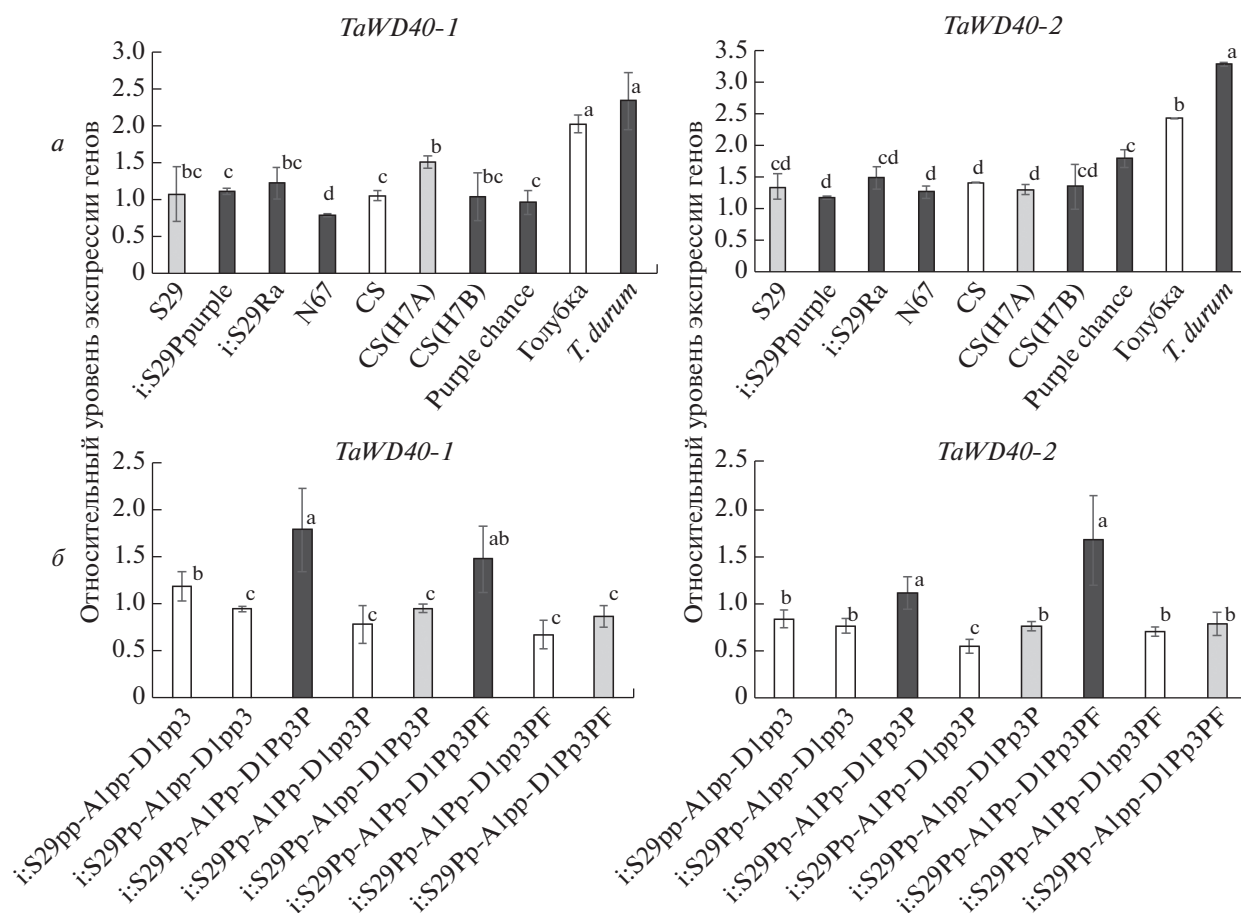
#### Анализ транскрипционной активности регуляторных генов *WD40* ячменя и пшеницы

**Экспрессия генов *WD40* ячменя.** Сравнительный анализ относительного уровня экспрессии генов проводили на кДНК тканей алейронового слоя, перикарпа, цветковой чешуи и стебля почти изогенных линий сорта Bowman, контрастных по антоциановой пигментации: “BW” (Bowman, NGB22812), “BA” (Intense blue aleurone, NGB20651) и “PLP” (Purple lemma and pericarp, NGB22213) (табл. 1). Экспрессия генов *WD40* ячменя наблюдалась на высоком уровне во всех проанализированных образцах вне зависимости от их окраски (рис. 2). При этом была отмечена тенденция к повышению количества мРНК гена *HvWD40-2* в сравне-

нии с геном *HvWD40-1* в тканях зерновки (алеюроновый слой, перикарп, цветковая чешуя) как у неокрашенного сорта BW, так и у пигментированных линий BA и PLP (рис. 2). Значимо данное отличие проявляется в алейроновом слое ячменя – экспрессия гена *HvWD40-2* в среднем выше в 3.5 раза в BW и в 5.2 раза в BA.

**Экспрессия генов *WD40* пшеницы.** На основе количественной ОТ-ПЦР, был определен суммарный уровень мРНК групп генов *TaWD40-1* и *TaWD40-2* в колеоптиле и перикарпе сортов и линий пшеницы, отличающихся антоциановой пигментацией (табл. 1). Показано, что данные гены экспрессируются на высоком уровне во всех проанализированных генотипах со значимым повышением уровня мРНК в окрашенном колеоптиле аллотетраплоидной линии *T. durum* TRI 15744 и неокрашенном колеоптиле аллогексаплоидной пшеницы сорта Голубка (рис. 3,а).

Уровень экспрессии *TaWD40* был проанализирован в перикарпе линий пшеницы Саратовская 29, отличающихся присутствием доминантных генов *Pp-A1*, *Pp-D1* и *Pp-3* (гены *TaMpc1-A1*, *TaMpc1-D1* и *TaMpc-A1*, соответственно), которые контролируют биосинтез антоцианов в этой ткани (табл. 1). Для групп генов *TaWD40-1* и *TaWD40-2* была отмечена тенденция к увеличению уровня мРНК в генотипах, несущих доминантные гены *TaMpc1-A1*,



**Рис. 3.** *a* – относительный уровень мРНК генов *TaWD40* в coleoptile пшениц, имеющих различную окраску (на пятый день после прорастания); *b* – относительный уровень мРНК генов *TaWD40* в перикарпе пшениц, имеющих различную окраску. Цвет колонки соответствует наличию антоцианового пигмента в анализируемой ткани. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела–Уоллиса. \* – различия статистически значимы при  $p \leq 0.05$ .

*TaMpc1-D1* и *TaMyc-A1*, т.е. обладающих интенсивной окраской перикарпа (рис. 3, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Белки семейства WD40 являются немногочисленным классом факторов транскрипции. Они 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 как неокрашенные флавоноиды, так и их окрашенные производные антоцианы [5, 8–10]. У представителей трибы Triticeae долгое время не было информации о локализации и первичной структуре WD40-кодирующих генов, способных регулировать синтез флавоноидов. Первым идентифицированным геном данного класса стала последовательность *HvWD40* (в настоящем исследовании *HvWD40-1*), идентифицированная в геноме ячменя обыкновенного в 2017 г. [12]. В настоящей ра-

боте *in silico* были идентифицированы WD40-кодирующие гены, локализованные в хромосомах 6L и 6S других представителей трибы Triticeae (рис. 1, табл. 3). Несмотря на то, что дивергенция между данными копиями произошла раньше расхождения рода *Zea* и трибы Triticeae, степень гомологии между полными кодирующими последовательностями копий *WD40-1* и *WD40-2* остается высокой и составляет около 60%. Поскольку белки данного класса могут регулировать столь разнообразные и важные клеточные процессы, то рабочее состояние генов, как и их первичная последовательность, вероятно, поддерживается отбором.

Экспрессия данных генов также поддерживается на высоком уровне в различных органах и тканях пшеницы и ячменя. При этом связь между уровнем экспрессии и пигментацией анализируемой ткани была выявлена только в перикарпе пшениц, обладающих насыщенной антоциановой окраской (рис. 3). Возможно, данные гены участвуют в биосинтезе неокрашенных флавоно-

идов в проанализированных тканях. При этом гены *WD40* других видов растений (например, картофеля) имеют несколько другой профиль экспрессии, который соотносится с интенсивностью цвета ткани [19]. Обнаруженное отсутствие связи между уровнем мРНК в coleoptile пшеницы и окраской ткани может свидетельствовать о перикарп-специфической вовлеченности данных генов в синтез антоцианов. У ячменя слабая тканевая специфичность была отмечена для *HvWD40-2* — данный ген проявил повышенную экспрессию в тканях зерновки ячменя (рис. 2). Предполагаем, что *HvWD40-2* вместе с R2R3-Myb-кодирующим геном *HvMpc1-H3* и bHLH-кодирующим геном *HvMyc2* [12, 20] в алейроновом слое образует регуляторный комплекс MBW, который необходим для активации структурных генов биосинтеза антоцианов в данной ткани. Таким образом, данная работа расширяет существующие представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе появления антоциановой окраски различных органов ячменя и пшеницы.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winkel-shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. № 2. P. 485–493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
2. Hichri I., Barrieu F., Bogs J. et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway // *J. Exp. Botany.* 2011. V. 62. № 8. P. 2465–2483. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq442>
3. Grotewold E. (Ed.). *The Science of Flavonoids.* Ohio: The Ohio State University Columbus, Springer, 2006. 273 p.
4. Falcone Ferreyra M.L., Rius S., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications // *Frontiers in Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
5. Xu W., Dubos C., Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes // *Trends in Plant Sci.* 2015. V. 20. № 3. P. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
6. Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings // *The Plant J.* 2008. V. 53. № 5. P. 814–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x>
7. Feller A., Machemer K., Braun E.L., Grotewold E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors // *The Plant J.* 2011. V. 66. № 1. P. 94–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>
8. van Nocker S., Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: Conservation and divergence in structure and function // *BMC Genomics.* 2003. V. 4. № 1. P. 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-50>
9. Mishra A.K., Puranik S., Prasad M. Structure and regulatory networks of WD40 protein in plants // *J. Plant Biochemistry and Biotechnology.* 2012. V. 21. № 1. P. 32–39. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0134-1>
10. Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. The WD repeat: A common architecture for diverse functions // *Trends in Biochem. Sci.* 1999. V. 24. № 5. P. 181–185. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01384-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01384-5)
11. Serna L., Martin C. Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures // *Trends in Plant Sci.* 2006. V. 11. № 6. P. 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.04.008>
12. 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. V. 17. № 1. P. 184. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1122-3>
13. Deng W., Nickle D.C., Learn G.H. et al. ViroBLAST: A stand-alone BLAST web server for flexible queries of multiple databases and user's datasets // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 17. P. 2334–2336. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm331>
14. Mitchell A.L., Attwood T.K., Babbitt P.C. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 47. № D1. P. D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
16. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. № 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030088>
17. Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software // *PCR Primer Design.* Humana Press, 2007. P. 35–59.
18. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome.* 2005. V. 48. № 4. P. 747–754. <https://doi.org/10.1139/g05-026>
19. Payyavula R.S., Singh R.K., Navarre D.A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism // *J. Exp. Botany.* 2013. V. 64. № 16. P. 5115–5131. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert303>
20. Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2018. Т. 22. № 3. С. 333–342.



## Structural and Functional Organization and Evolution of the *WD40* Genes Involved in the Regulation of Flavonoids Biosynthesis in Triticeae Tribe

K. V. Strygina<sup>a, b, \*</sup> and E. K. Khlestkina<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Center, the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint Petersburg, 190121 Russia

<sup>b</sup>Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: k.strygina@vir.nw.ru

A specific protein complex MBW, which is forming by interaction of R2R3-Myb, bHLH and WD40 transcription factors, regulates the biosynthesis of flavonoids in plants. The genomes of Triticeae tribe members are characterized by the presence of orthologous and homeologous copies of the flavonoid biosynthesis regulatory genes. The structural and functional organization of the R2R3-Myb and bHLH factors is well studied, while the genes encoding the third component of the MBW complex in Triticeae – the WD40 factor – remained poorly studied. In the current work, a search and analysis of *WD40* genes in genomes of the *Hordeum*, *Triticum* and *Aegilops* genera members was carried out. As a result, two paralogous groups of genes (*WD40-1* and *WD40-2*) located on the long and short arms of chromosomes of the sixth group were identified. It was shown that the conservatism of the identified *WD40* sequences is supported by selection. The expression of *WD40-1* and *WD40-2* genes was at a high level in various organs and tissues of wheat and barley, regardless of the pigmentation. It is assumed that these genes could be involved in the biosynthesis of uncolored flavonoid pigments as well as in the biosynthesis of anthocyanins.

**Keywords:** *Aegilops*, flavonoid biosynthesis, *Hordeum*, MBW, transcription factor, Triticeae, *Triticum*, WD40.