

DETERMINATION OF CANDIDATE SEQUENCES CHALCONE ISOMERASE AND DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE IN WHEAT

STANOVENÍ KANDIDÁTNÍ SEKVENCE CHALKON IZOMERÁZY A DIHYDROFLAVONOL REDUKTÁZY U PŠENICE

Ondroušková J., Vyhnánek T., Musilová M. Trojan V., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: jana.ondrouskova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work is identification of genes from the anthocyanins biosynthetic pathway that are responsible for grain color and comparison of their sequences. We used ripened caryopsis of spring wheat with different coloration of the aleurone and pericarp layers as an experimental material. Genotypes UC66049 and Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen have blue aleurone. Genotypes Abissinskaja arrasajta and ANK-28B have purple pericarp. Genotype Novosibirskaja 67 was used as standard. It has a white caryopsis as well as a genotype Heroldo (a form of winter wheat). RNA from caryopsis was isolated using phenol-chloroform extraction and reverse transcribed into cDNA. House keeping gene GAPDH (the gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was chosen as a control for PCR to verify the successful transcription of cDNA. For designing primers we used the cDNA sequences for CHI and DFR obtained from the database NCBI were used for primers designing. Via PCR reactions were amplified segments of sequences for CHI and DFR, which were used for direct sequencing of PCR product. The obtained candidate sequences were compared with sequences in the NCBI database and their polymorphisms were evaluated. We acquired a partial sequence for genes chalcone isomerase and dihydroflavonol reductase. By comparing sequences for each gene was found homology in the range from 95 to 100%. The variability caused single nucleotide polymorphism and indels. Sequences were sent to the Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc. There were compared our cDNA sequences with BAC library of wheat chromosomes. A sequence for CHI was found on chromosome 5B. In the case of DFR was found a sequence on 3B and on long arm 3A chromosome. Downstream step in this work is to get the whole sequence of the transcribed genes by 3'RACE and 5'RACE PCR reactions. Furthermore, the complete cDNA sequences will be compared with genomic DNA sequences to determine the presence of introns in genes. Finally, the data will be used for the design of qPCR for the study of genes expression during caryopsis maturation.

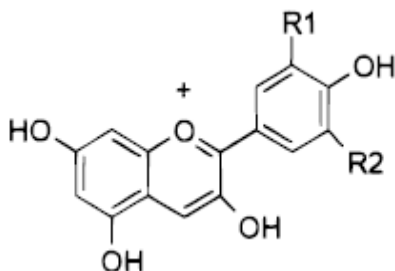
Key words: wheat, chalcone isomerase, dihydroflavonol reductase

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge Mgr. Jan Bartoš, Ph.D. from Institute of Experimental Botany, Olomouc. We also thank Ing. Tomáš Koloušek, Head of Botanical Gardens and Arboretum for cultivating plant material. This study was supported by project GAČR No. 204/09/H002.

ÚVOD

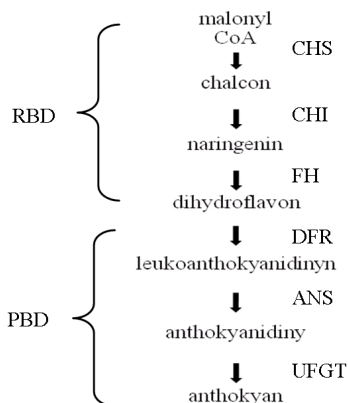
Chalkon izomeráza (CHI) a dihydroflavonol reduktáza (DFR) jsou enzymy, které se účastní biosyntetické dráhy anthokyanů. Anthokyany jsou přírodní pigmenty, které zbarvují květy, listy, plody, semena a další pletiva do modré, purpurové až oranžové barvy. V pšenici seté (*Triticum aestivum*) zodpovídají mj. za různé zbarvení obilek. Modrá barva je ukládána v aleuronové vrstvě obilky, purpurová barva v perikarpu. V současné době bylo popsáno více než 500 druhů anthokyanů. Jsou vysoce ceněné nejen pro své organoleptické vlastnosti, ale zejména pro blahodárný vliv na zdraví. Jejich benefitem je zejména antioxidační aktivita a pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Anthokyany jsou na světle nestabilní a ve vodě nerozpustné, tudíž se obvykle přirozeně nenachází ve volném stavu. Místo toho se ve vakuolách buňky vyskytují sloučené s cukry, které jim poskytují stabilitu a rozpustnost ve vodě. V takovém případě je aglykonová (necukerná) část označována jako anthokyanidiny (de Pascual-Teresa *et al.*, 2010). Obecné schéma nejběžnějších anthokyanidinů je zobrazeno na obrázku 1. V širším slova smyslu můžeme v souvislosti s anthokyany hovořit o biosyntetické dráze flavonoidů, jelikož anthokyany do této skupiny spadají společně s chalkony, aurony, flobafeny a dalšími látkami. První v biosyntetické dráze flavonoidů je enzym chalkon syntáza, který katalyzuje vznik chalkonu. Biosyntetická cesta dále vede s několika enzymatickými kroky k ostatním třídám flavonoidů, jako jsou flavonoly, dihydroflavonoly a nakonec k anthokyanům. Další třídy flavonoidů (tj. izoflavony, aurony, flavony a pro-anthokyanidiny) představující vedlejší větve flavonoidů, které jsou odvozeny z meziproductů anthokyanových sloučenin (Ahmed *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2008; Schijlen *et al.*, 2004). Geny pro enzymy uplatňující se v biosyntetické dráze anthokyanů (obr. 2) jsou rozdělovány na dvě skupiny: geny rané biosyntézy a geny pozdní biosyntézy. V této práci se zabýváme genem pro chalkon izomerázu, která patří do rané biosyntetické dráhy a genem pro dihydroflavonol reduktázu, která je řazena do pozdní biosyntetické dráhy.

Obr. 1: Obecné schéma nejběžnějších anthokyanidinů



Anthokyanidin	R1	R2
pelargonidin	H	H
kyanidin	OH	H
delfinidin	OH	OH
peonidin	OCH ₃	H
petunidin	OCH ₃	OH
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

CHS – chalkon syntáza, CHI – chalkon izomeráza, FH – flavanon hydroxyláza, DFR – dihydroflavonol reduktáza, ANS – anthokyanidyn syntáza, UFGT – UDPG-flavonoid glukosyl transferáza, RBD - raná biosyntetická dráha, PBD – pozdní biosyntetická dráha



MATERIÁL A METODIKA

Jako materiál byly použity obilky pšenice jarní formy s nestandardním zbarvením obalových vrstev (obr. 3). Genotyp UC66049 a Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen mají modře zbarvený aleuron. Genotypy Abissinskaja arrasajta a ANK-28B se vyznačují purpurovým perikarpem. Genotyp Novosibirskaja 67 byl použit jako standard a vyznačuje se bílou barvu obilky stejně jako odrůda Heroldo (ozimá forma pšenice). Vzorky osiva byly získány z Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž. Rostliny byly vypěstovány v maloparcelkovém pokusu na pozemku Arboreta MENDELU ve vegetačním období 2010/2011.

Z obilek byla fenol-chloroformovou extrakcí izolována celková RNA a přepsána pomocí komerčního kitu (M-MLV Reverzní transkriptáza, Top-Bio) do cDNA. Ověření úspěšnosti přepisu bylo provedeno prostřednictvím provozního genu GAPDH (gen pro glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázu), který byl vybrán dle Wang et al. (2003). Při návrhu primerů byly použity sekvence cDNA získané z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Pro CHI byla vybrána sekvence cDNA s kódovým označením v databázi AB187026.1. Pro DFR byla vybrána sekvence s kódovým označením AB162138. Primery byly navrženy pomocí programu Primer3. K zjištění optimální teploty anealingu navržených primerových kombinací byla provedena gradientová PCR. PCR reakcí byly amplifikovány úseky sekvencí pro CHI a DFR, které byly po purifikaci použity pro přímé sekvenování PCR produktu, které bylo provedeno

specializovanou laboratoří (Macrogen, Holandsko). Získané kandidátní sekvence byly pro vyhodnocení polymorfizmu porovnány programem ClustalW2 vzájemně mezi sebou a se sekvencí z databáze NCBI, podle které byly navrženy primery. Sekvence byly odeslány do laboratoře molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky, Olomouc. Zde bylo provedeno porovnání získaných sekvencí se sekvencemi v BAC knihovně jednotlivých chromozomů pšenice seté.

Obr. 3: Použité genotypy pšenice

a) UC66049, b) Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, c) Novosibirskaja 67, d) Abissinskaja arrasajta, e) ANK-28B



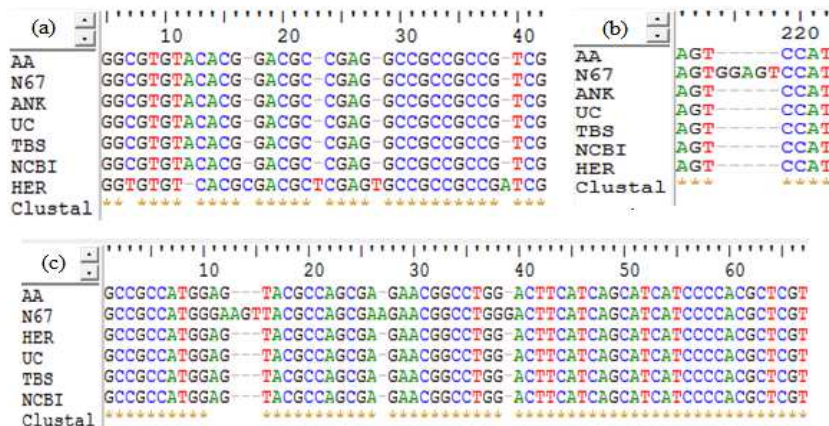
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky sekvenování PCR produktu pro CHI: sekvenováním jarních forem pšenice seté (genotypy UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Abissinskaja arrasajta, ANK-28B a Novosibirskaja 67) jsme získali sekvenační data fragmentu DNA o velikosti 335 bp. Pro genotyp Heroldo byla velikost sekvence 338 bp. Odchylka v počtu bazí nukleotidů je dána jednonukleotidovými insercemi/delecemi (dále jen indel) (obr. 4a). V jednom případě jsme našli indel o velikosti 5 bp (obr. 4b). Tento indel přerušuje čtecí rámec a může způsobit nefunkčnost nově vznikajícího proteinu. Ze získaných dat není možné určit, jestli se jedná o inserci v genotypu Novosibirskaja 67 nebo o delecii v sekvenci ostatních genotypů. Vzájemná podobnost mezi sekvencemi se pohybovala v rozmezí hodnot 98 - 100 %. Variabilita v sekvencích byla mírně ovlivněna i jednonukleotidovým polymorfizmem, který jsme u CHI zaznamenali pouze v jednom případě, a to u genotypu Heroldo. Musilová *et al.* (2011) detekovali v sekvenci chalkon syntázy několik podobných případů jednonukleotidového polymorfizmu, nicméně nedetekovali žádný indel.

Sekvenováním PCR produktu pro DFR: jsme získali data o velikosti 148 bp pro genotypy UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Abissinskaja arrasajta, ANK-28B a Heroldo. U genotypu Novosibirskaja 67 byla získaná sekvence veliká 153 bp. Odchylka ve velikosti sekvenačních dat u genotypu Novosibirskaja 67 je způsobena třemi indely (obr. 4c). První indel je velikosti tří nukleotidů. Další dva indely jsou jednonukleotidové. Vzájemná podobnost mezi sekvencemi se pohybovala v rozmezí hodnot 95 - 100%, což je vyšší stupeň podobnosti jaký zjistili Trojan *et al.* (2011) v případě chalkon syntázy (82 - 100%).

Porovnání sekvencí pro CHI a DFR s BAC knihovnou pšenice seté: sekvence DFR byla nalezena ve dvou kopiích. Na chromozomu 3B a na dlouhém rameni chromozomu 3A. Himi a Noda (2004) lokalizovali gen pro DFR na chromozomech 3A, 3B a 3D. Shoda v sekvencích se u jednotlivých genotypů pohybovala v rozmezí 96 – 98 %. V případě CHI byla nalezena shoda na dlouhém rameni chromozomu 5B. Podobnost byla 98 – 100%. Data pro chromozom 5DL nejsou v současné době dostupná a proto je možné, že kopie genu CHI se nachází i v této oblasti.

Obr. 4. Vybrané úseky sekvencí



(a) jednonukleotidové indely v sekvenci CHI

(b) indel přerušující čtecí rámec v sekvenci CHI

(c) indely v sekvenci DFR

AA - Abissinskaja arrasajta, N67 - Novosibirskaja 67, ANK - ANK-28B, UC - UC66049, TBS - Tchermaks Blaukörniger Sommerweizen, NCBI – sekvence použitá pro návrh primerů, HER – Heroldo

ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že sekvenční analýzou jsme získali částečnou sekvensi pro geny CHI a DFR. Po srovnání byla zjištěna vzájemná homologie mezi sekvencí v rozmezí 95 - 100%. Bylo potvrzeno, že navržené primery skutečně amplifikují úseky genu CHI a DFR. V sekvencích se podařilo detekovat jednonukleotidové polymorfizmy i indely, které narušují čtecí rámec a mohou tak mít významný vliv na funkčnost nově vznikajícího transkriptu. Porovnáním sekvencí cDNA pro DFR s BAC knihovnou pšenice seté jsme zjistili přítomnost genu ve dvou kopiích (chromozom 3B a dlouhé rameno 3A). V případě CHI byl gen lokalizován na chromozomu 5B. Navazujícím krokem na tuto práci je získat sekvensce celé části transkribovaných genů prostřednictvím 3'RACE a 5'RACE PCR reakce. Dále porovnat sekvensi kompletní cDNA se sekvencí genomické DNA

a zjistit tak oblasti intronů v genech. V neposlední řadě budou data sloužit pro návrh qPCR pro studium exprese genů v průběhu zrání obilky.

LITERATURA

Ahmed N., Maekawa M., Noda K. (2009): Anthocyanin accumulation and expression pattern of anthocyanin biosynthesis genes in developing wheat coleoptiles. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 223-228.

Himi E., Noda K (2004): Isolation and location of free homoelogenous dohydroflavonol-4-reductase (DFR) gene of wheat and their tissue-dependent expression. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 365-375.

Musilová M., Trojan V., Vyhnánek T., Martinek P., Havel L. (2011): Application of genetic markers in wheat donors with unusual kernel colour. *Agriculture*, 57 (4): 19.

de Pascual-Teresa S., Moreno A. D., García-Viguera C. (2010): Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (4): 1679-1703.

Schijlen E. G., Ric de Vos CH., van Tunen A. J., Bovy A. G. (2004): Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65 (19): 2631-2648.

Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54 (4), 733-749.

Trojan V., Musilová M., Vyhnánek T., Havel L. (2011): Chalkon synthase gene detection in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 57 (4), 23.

Wang A., Xia Q., Xie W., Datla R., Selvaraj G. (2003): The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (24): 14487-14492