



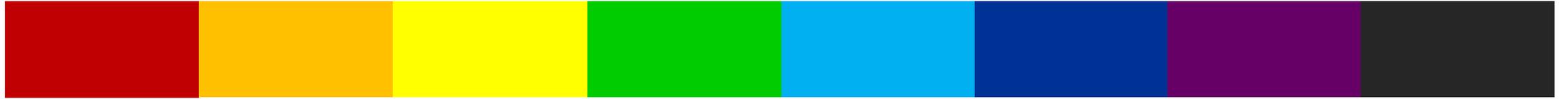
Меланин: загадочный пигмент растений

Анастасия Глаголева

Студентка 2-го курса магистратуры ФЕН НГУ

Сектор функциональной генетики злаков ИЦИГ СО РАН

Пигменты растений

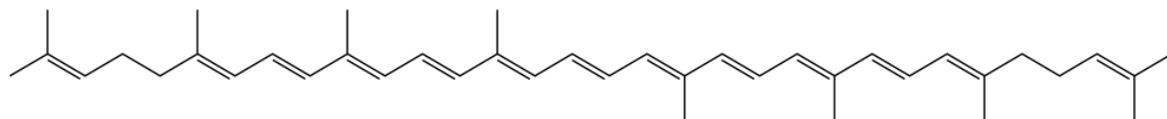


Пигменты растений

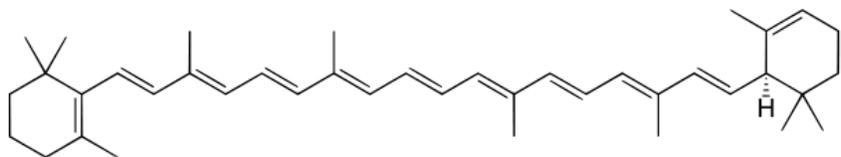
Каротиноиды



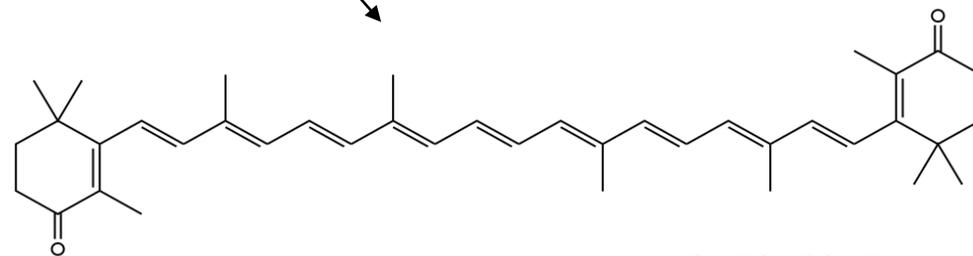
Каротиноиды



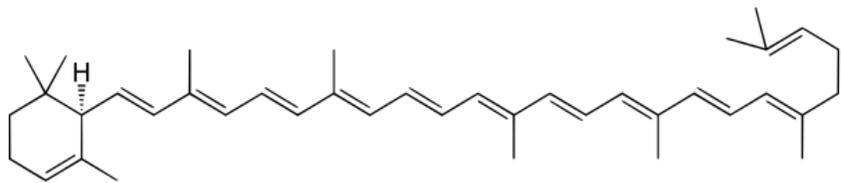
ЛИКОПИН



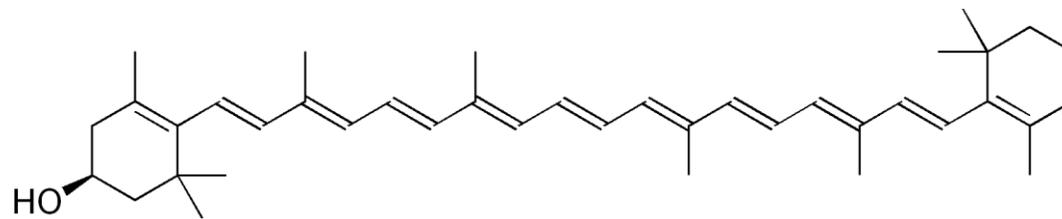
α -каротин



кантаксантин



β -каротин

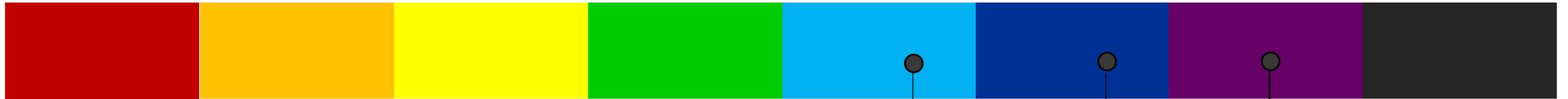


криптоксантин

каротины

КСАНТОФИЛЛЫ

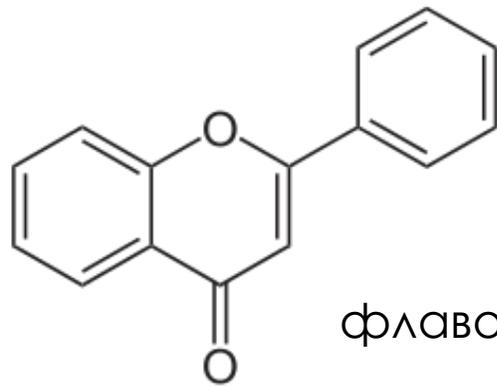
Пигменты растений



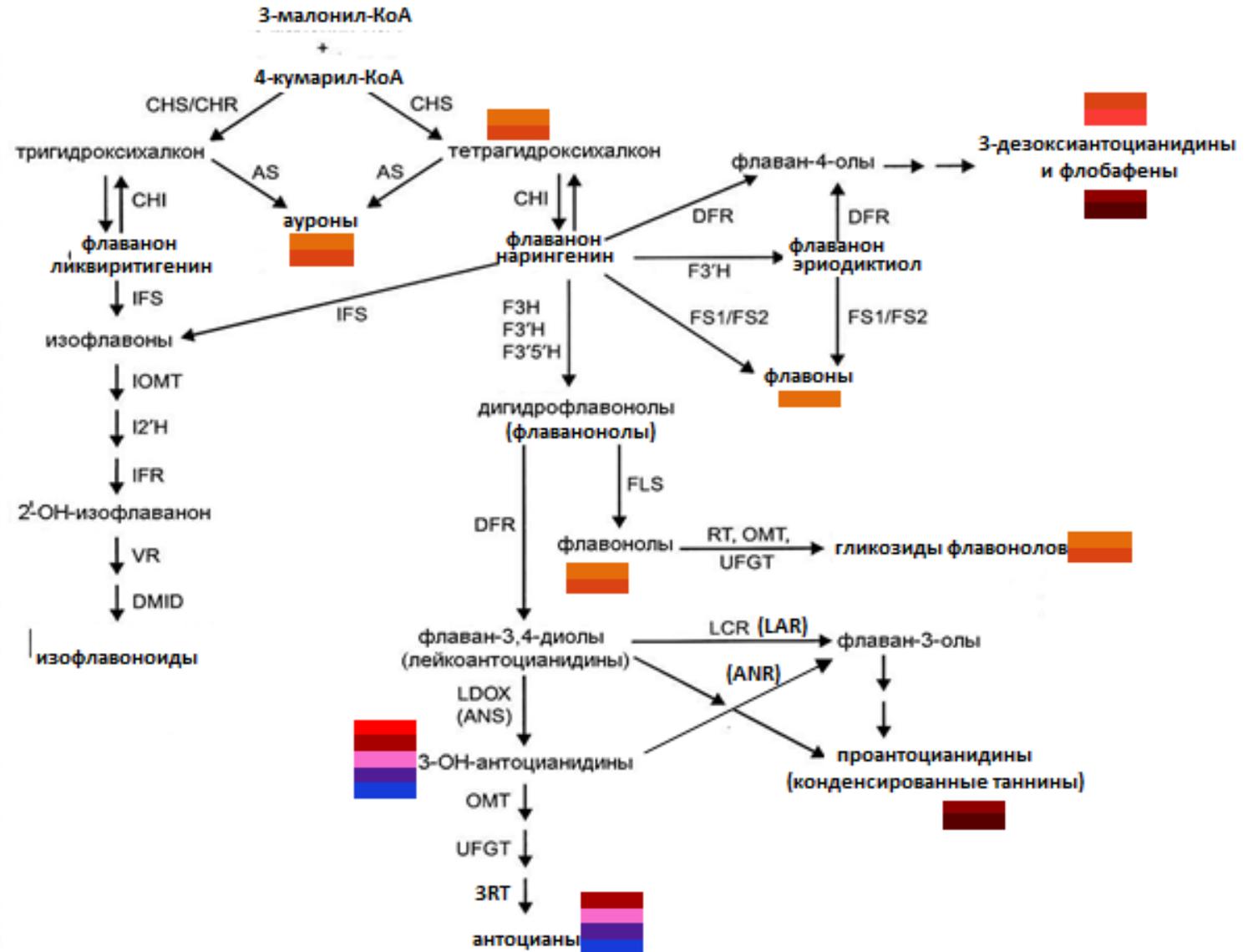
Флавоноиды
(антоцианы)

ФЛАВОНОИДЫ

Путь биосинтеза флавоноидов

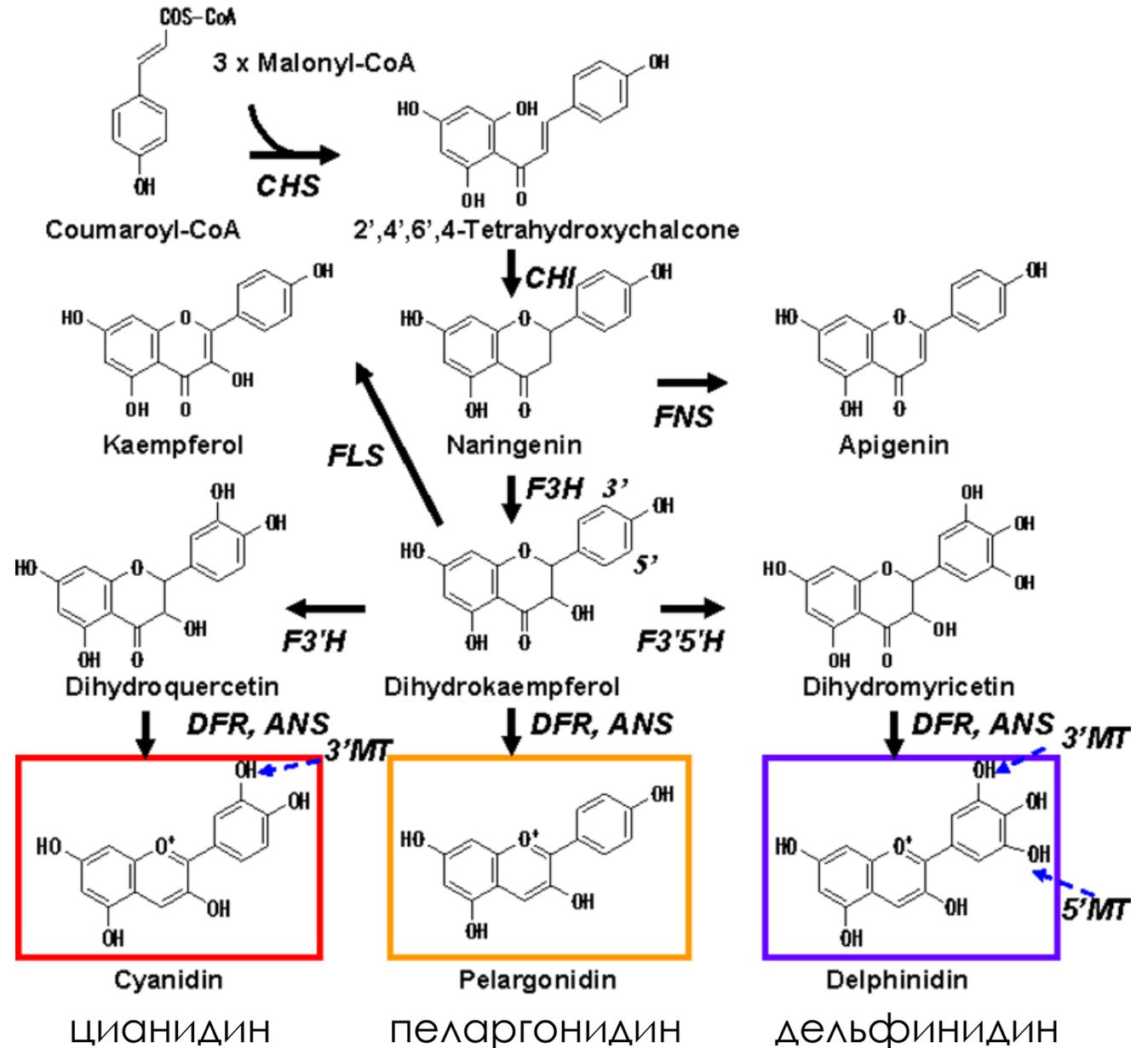
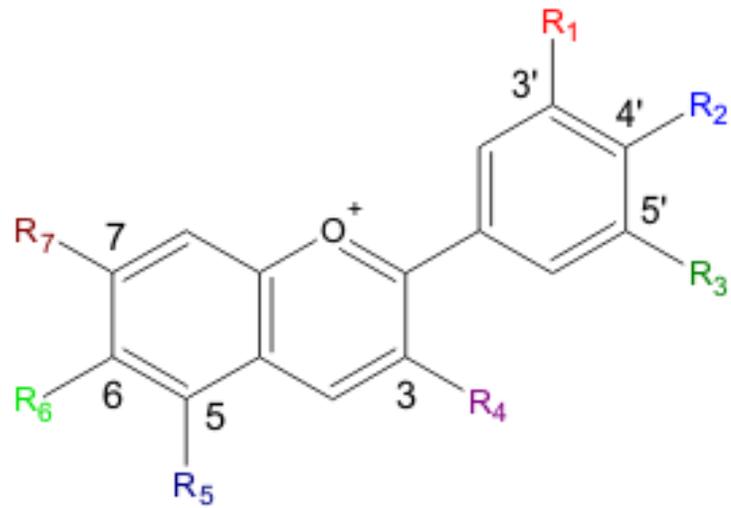


флавонон



ФЛАВОНОИДЫ

Структура антоцианов



ЦИАНИДИН

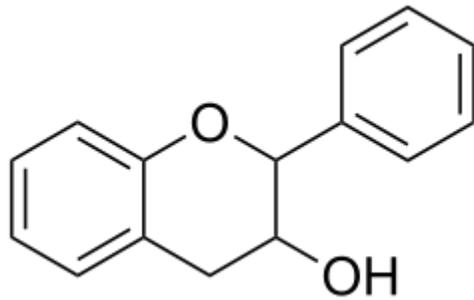
пеларгонидин

дельфинидин

Флавоноиды

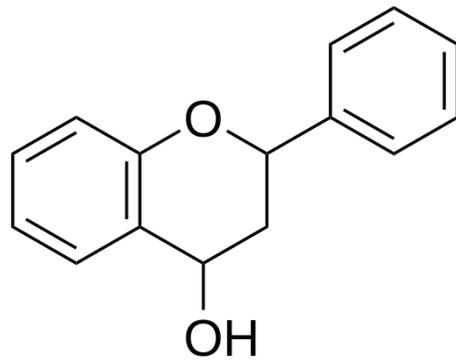
Полимерные производные флавоноидов

проантоцианидины
(конденсированные танины)



флаван-3-ол

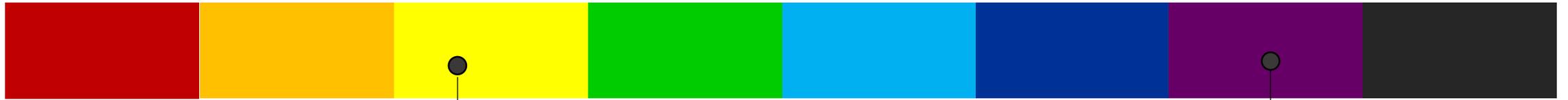
флобафены



флаван-4-ол



Пигменты растений



Беталаины

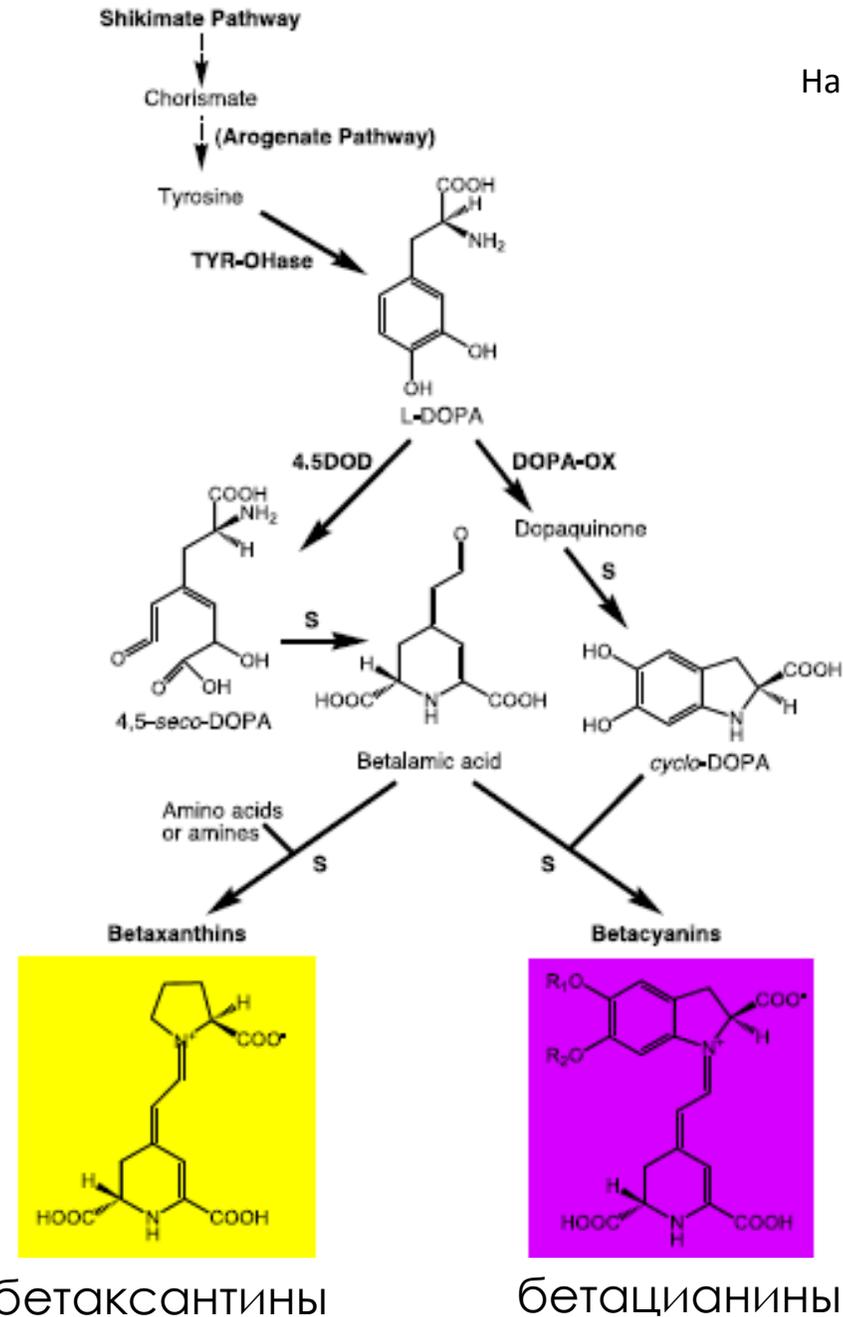
Беталаины

Harris et al., 2012

Синтезируются у растений, относящихся к порядку Гвоздичноцветные (*Caryophyllales*), а также у некоторых видов грибов.

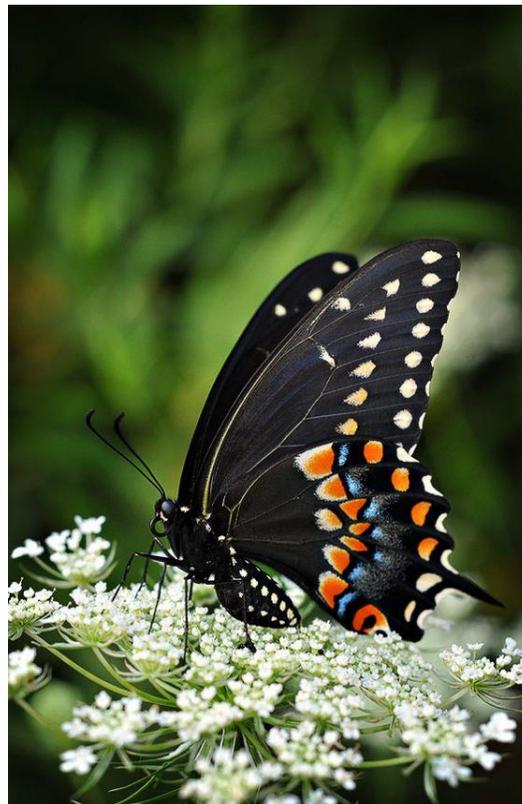
У одного вида не могут синтезироваться одновременно и антоцианы, и беталаины.

Биосинтез осуществляется при участии фермента тирозиназы.



Меланины

Нерастворимые полимерные пигменты, ответственные за большинство природных окрасок черного цвета.



Меланины

Также данный термин используют для описания сходных полимерных веществ, обуславливающих природную коричневую, красную и желтую окраску.



Трудности, возникающие при изучении меланинов:

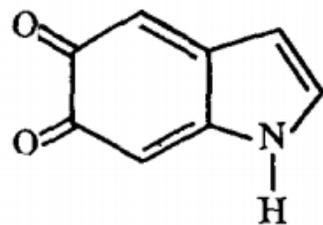
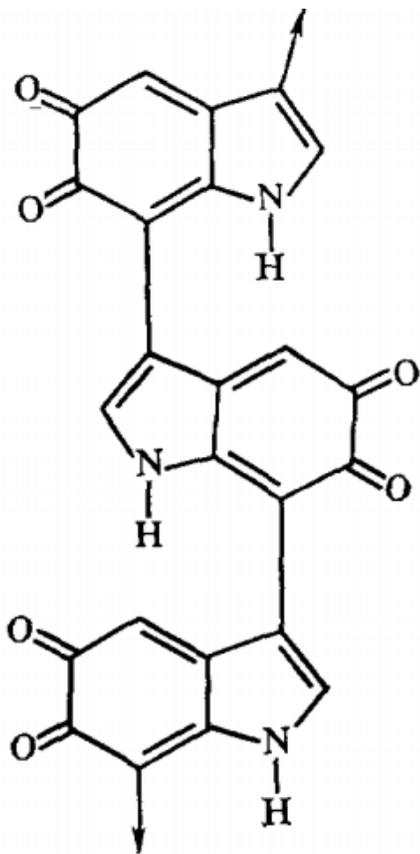
Термин «меланин» не несет информации о химической структуре пигментов.

Меланины устойчивы к действию растворителей, поэтому их трудно выделить и очистить.

Отсутствуют общие методы для расщепления молекулы меланина.

Структура меланинов

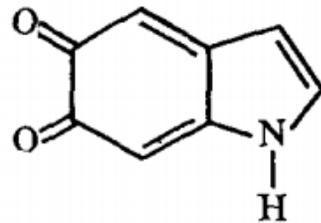
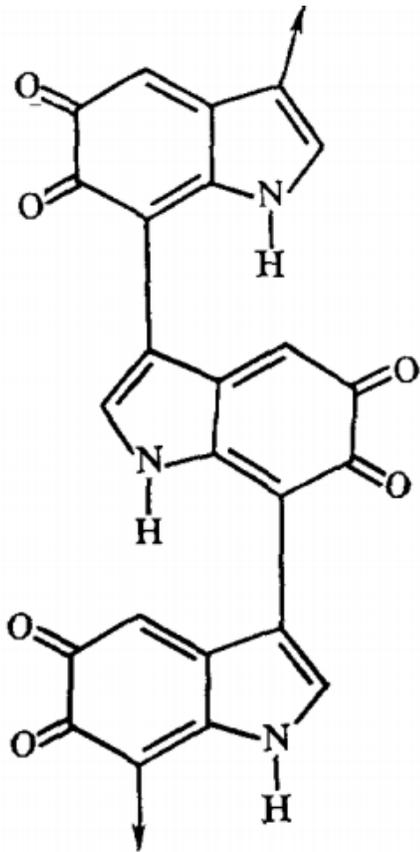
Меланины – полимеры хиноидных соединений



ИНДОЛ-5,6-КИНОН

Структура меланинов

Меланины – полимеры хиноидных соединений



индол-5,6-хинон

Но не все так просто...

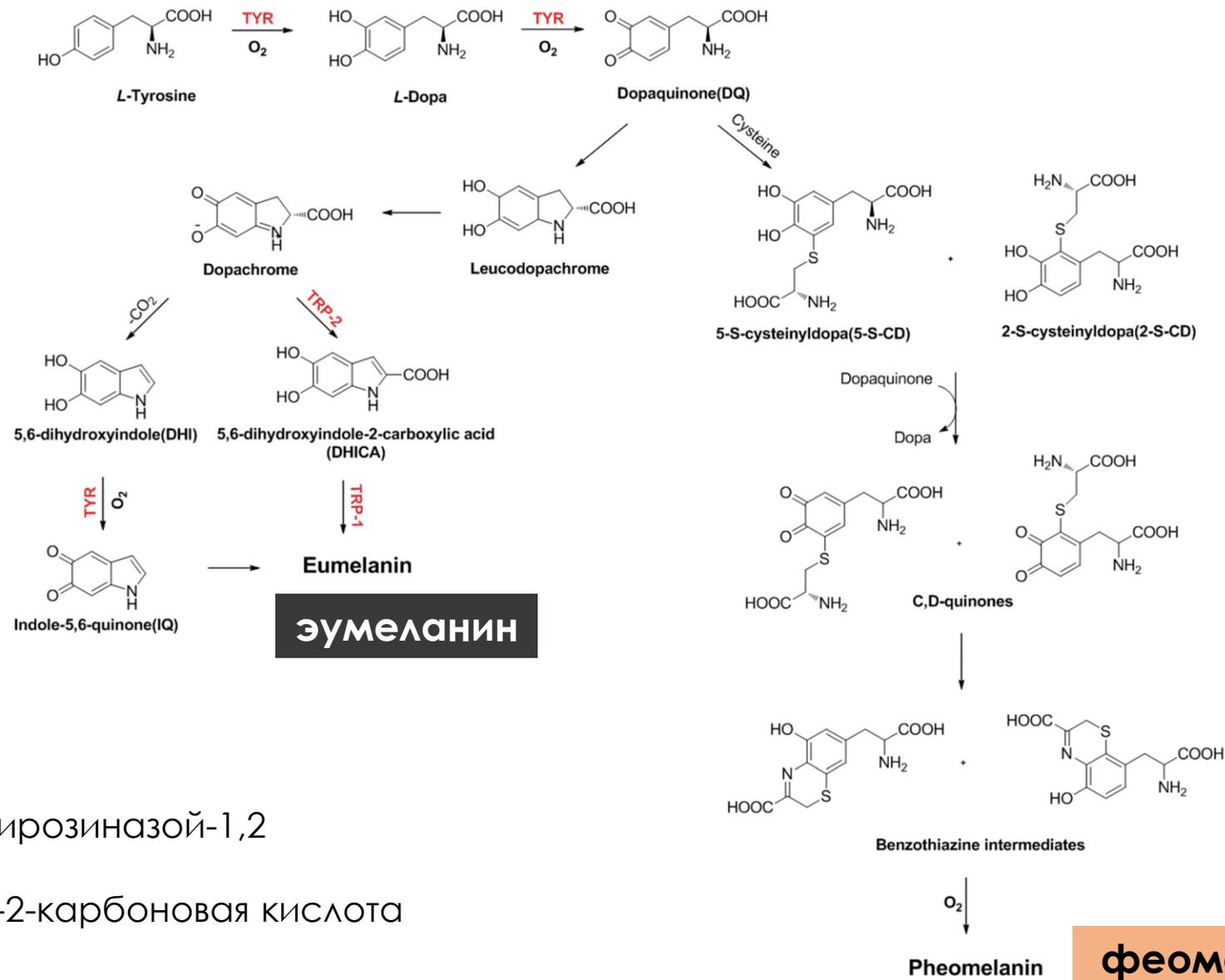
Любой образец меланина с большой вероятностью состоит из смеси макромолекул.

Как правило, меланины не являются гомополимерами и состоят из различных мономерных единиц.

Меланины, полученные из различных живых организмов, могут быть построены из разных мономеров.

Биосинтез меланина

Niu and Aisa, 2017



TYR – тирозиназа

TRP-1,2 – белки, связанные с тирозиназой-1,2

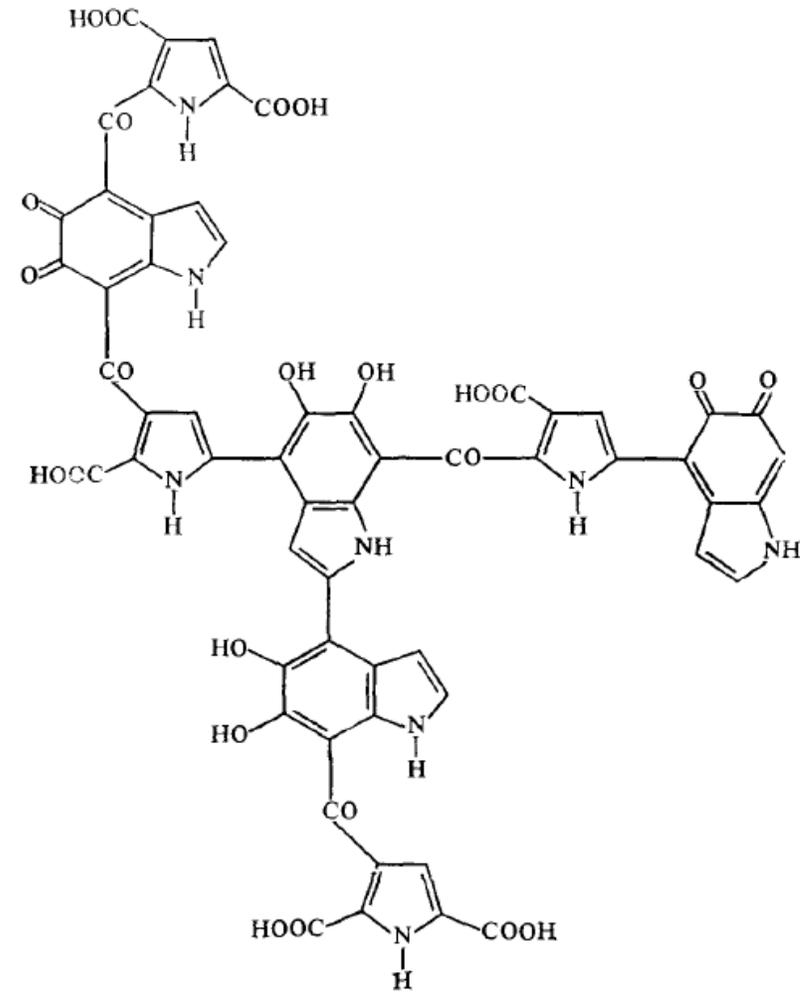
DHI – 5,6-дигидроксииндол

DHICA – 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновая кислота

IQ – индол-5,6-хинон

Ключевые моменты биосинтеза меланина:

1. Начальные этапы включают ферментативное окисление фенолов или полифенолов до хинонов.
2. Хиноны полимеризуются с образованием окрашенных меланинов.



СЕПИОМЕЛАНИН

Фитомеланины – меланины растений

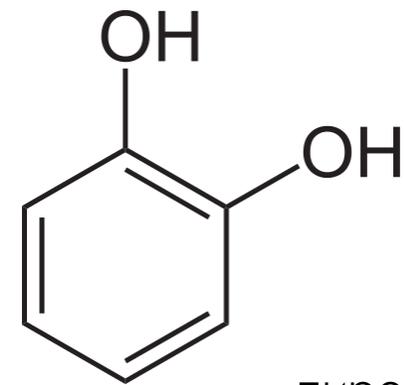


Что о них известно на данный момент:

- Фитомеланины - плотные, черные вещества, нерастворимые в воде, кислотных растворителях и щелочах.
- Химическая структура фитомеланинов все еще не установлена.
- Согласно некоторым предположениям, фитомеланины представлены смолистыми веществами или таннинами, либо состоят из полиацетиленов, либо представлены поливиниловыми спиртами.

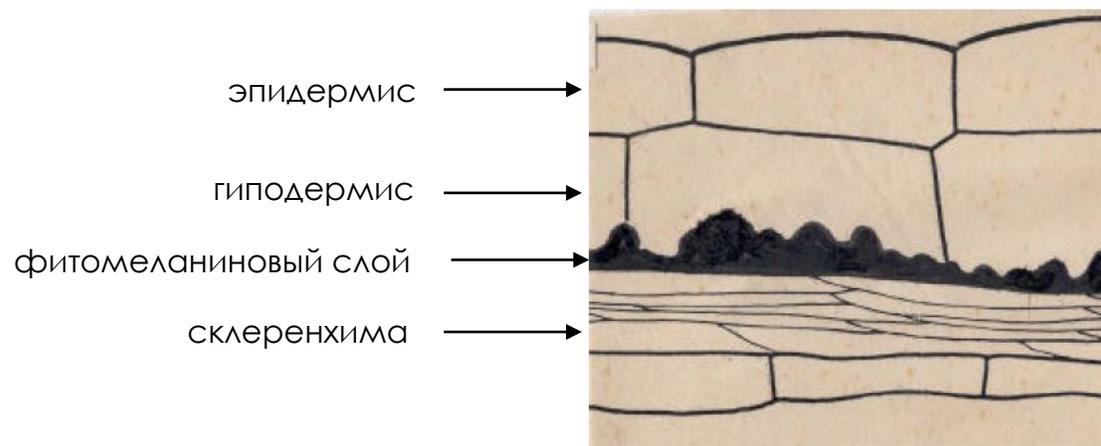
В отличие от меланинов животных фитомеланины не содержат азот, поэтому не могут являться производными индола.

Возможно, фитомеланины являются полимерными производными простых фенолов, например, пирокатехина.



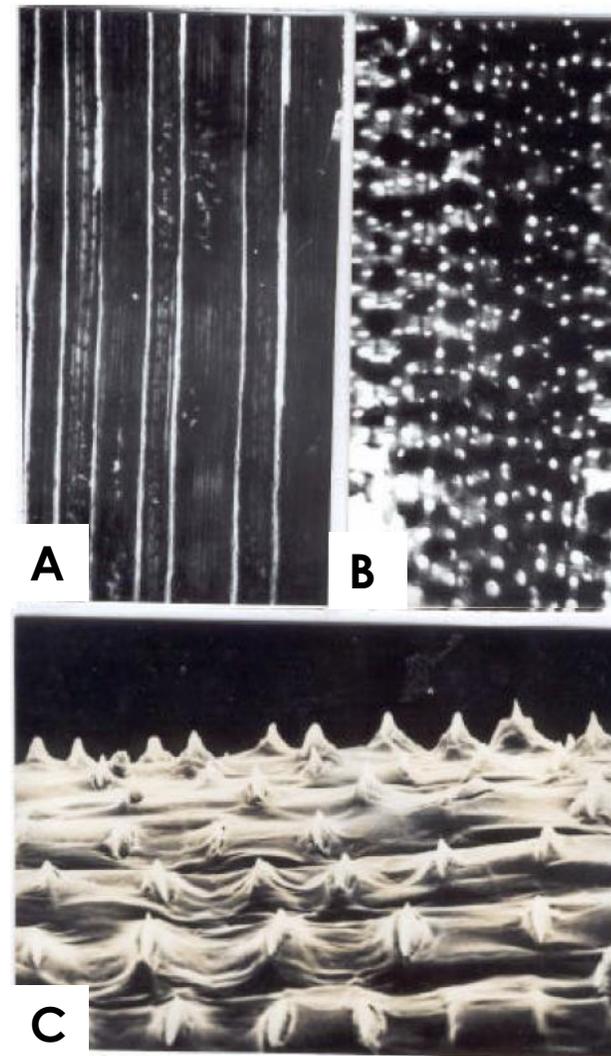
пирокатехин

Фитомеланиновый слой в оболочках семян растений



А, В – полосы фитомеланина и поры в фитомеланиновом слое в перикарпе космеи (*Cosmos bipinnatus*)

С – выросты, образуемые фитомеланином у кореопсиса (*Coreopsis tinctoria*)



Vlp – локус, связанный с черной окраской леммы и перикарпа

Плейотропные эффекты локуса **Vlp**:

Формирование черной окраски семян

Устойчивость к окислительному стрессу

(за счет повышенного содержания антиоксидантов)

Устойчивость к действию патогенов

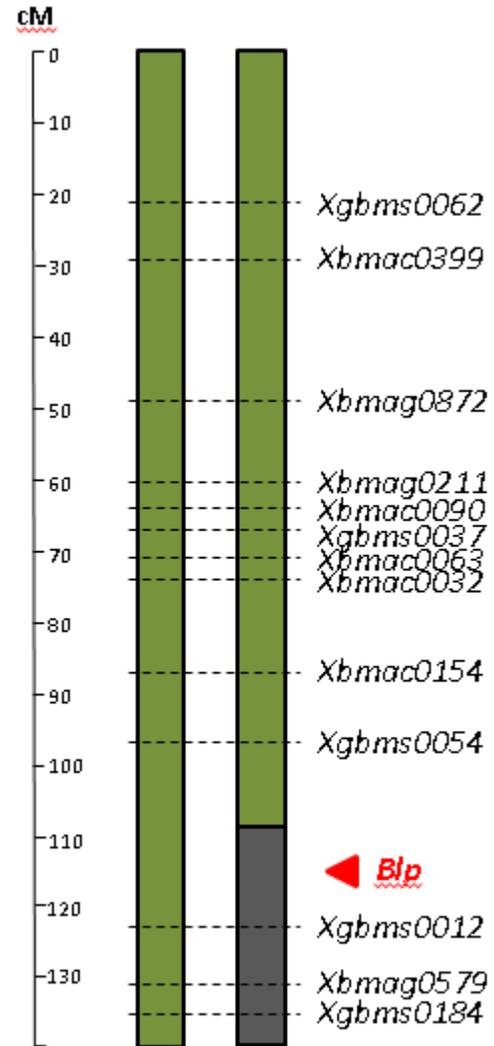
(черная окраска связана с повышенной устойчивостью к возбудителю заболевания фузариоза колоса - *Fusarium graminearum* у ячменя (Choo et al., 2005) и овса (Loskutov et al, 2016))



Изогенные линии (near-isogenic lines, NILs) – подходящая модель для сравнительных исследований



Bowman
(NGB22812)

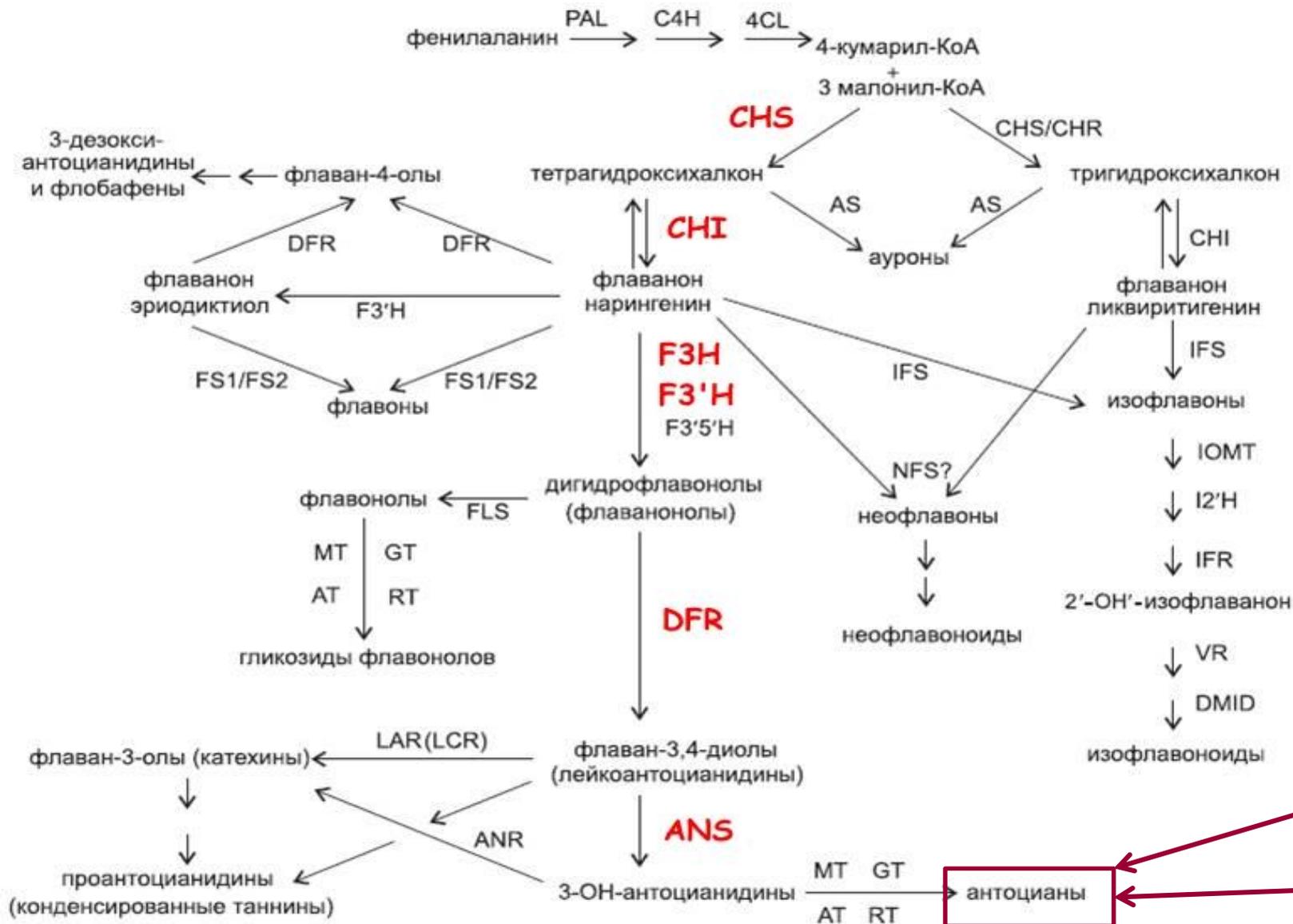


chromosome 1H



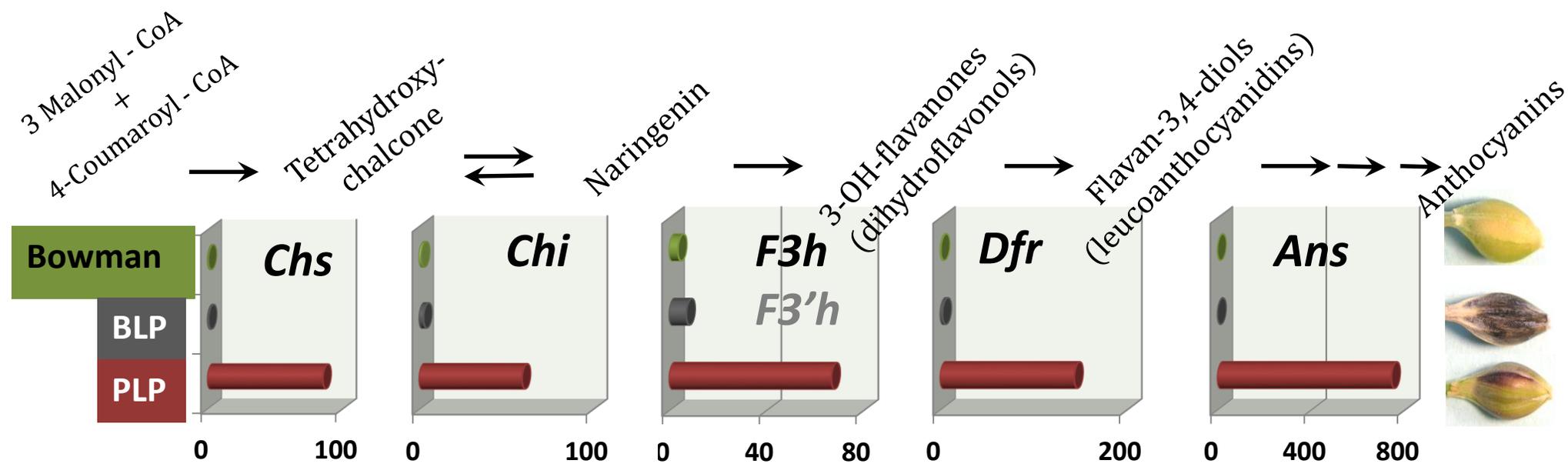
BLP
(NGB20470)

Путь биосинтеза флавоноидов



Первый этап исследования

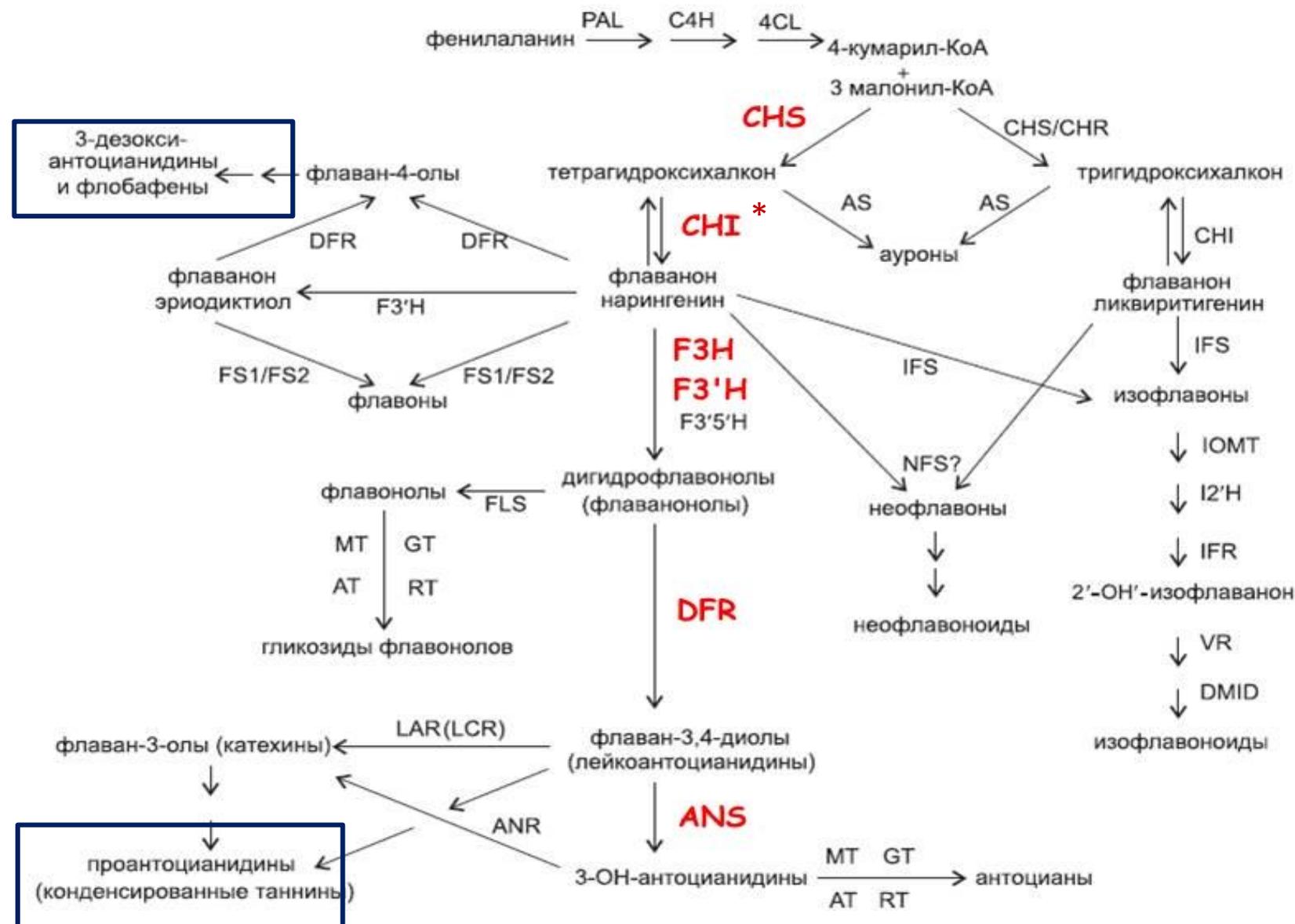
Проверка гипотезы о том, что черные пигменты являются полимерными производными флавоноидов.



Уровень экспрессии генов

Путь биосинтеза флавоноидов

* Экспрессия гена, кодирующего халконсинтазу (CHI) в линии VLP в 2 раза выше, чем в линии Bowman. Однако, количественные различия в экспрессии не объясняют фенотипические различия между линиями.



Второй этап исследования

Идентификация генов с дифференциальной экспрессией в окрашенной линии BLP и неокрашенной линии Bowman, используя метод RNA-seq.

Bowman



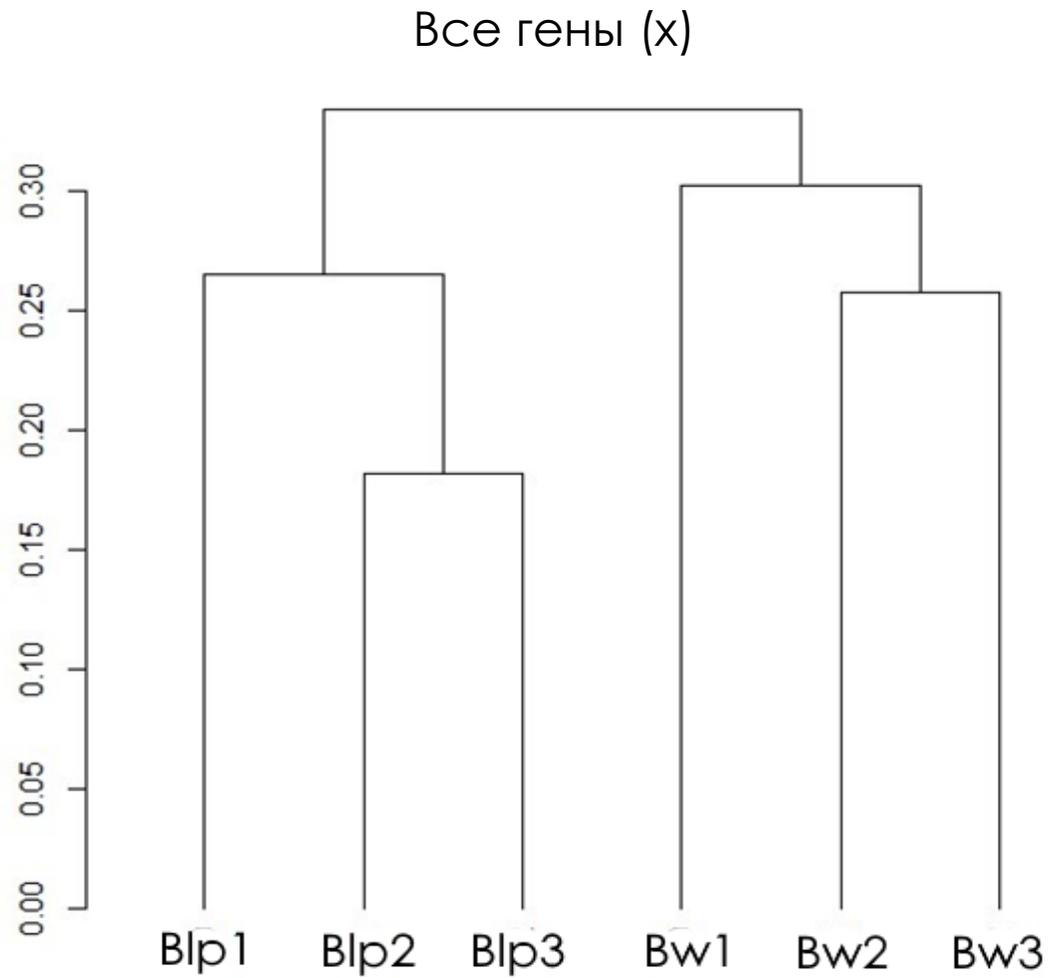
vs.

BLP





Кластерный анализ библиотек

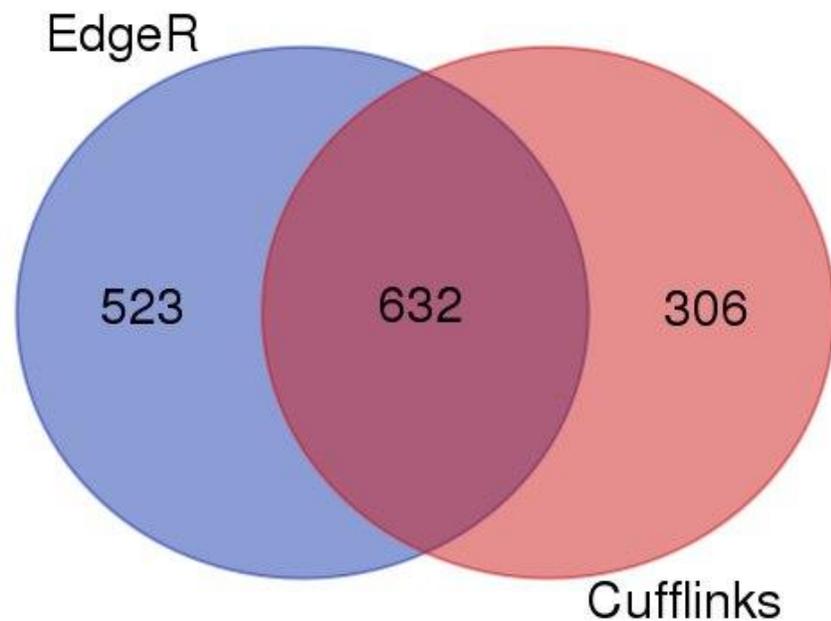


BLP

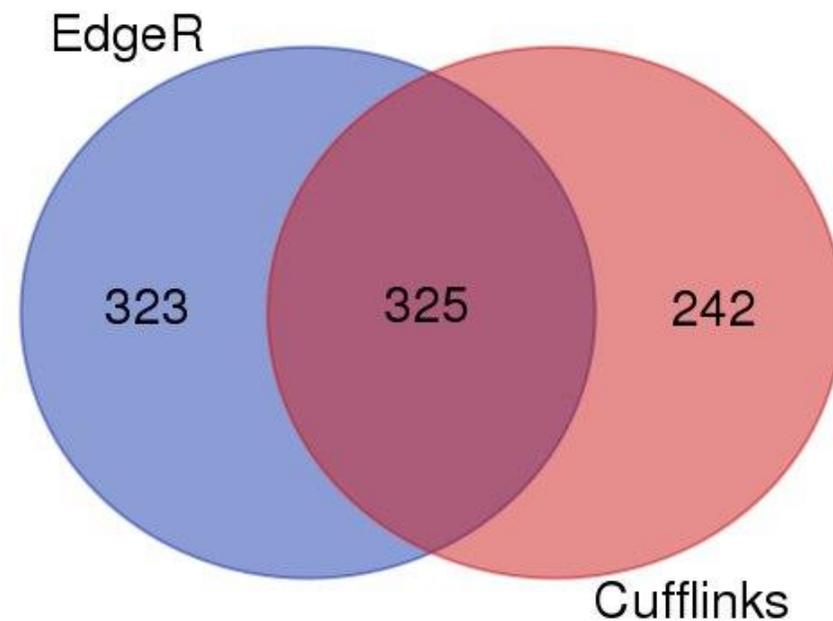
Bowman

Идентификация генов с дифференциальной экспрессией (ДЭГ)

Гены с повышенным уровнем экспрессии в линии **BLP**



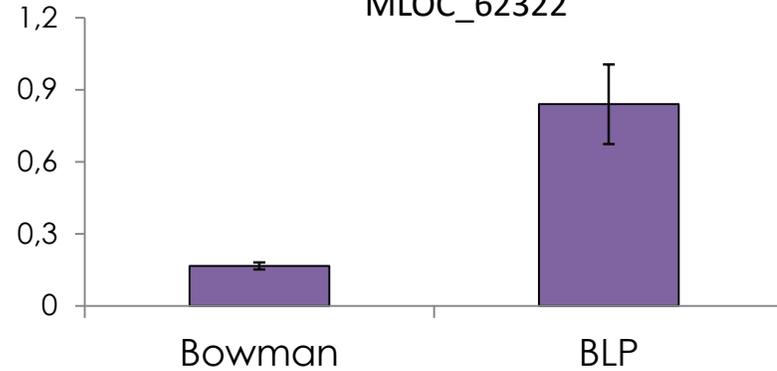
Гены с повышенным уровнем экспрессии в линии **Bowman**



qRT-PCR верификация ДЭГ

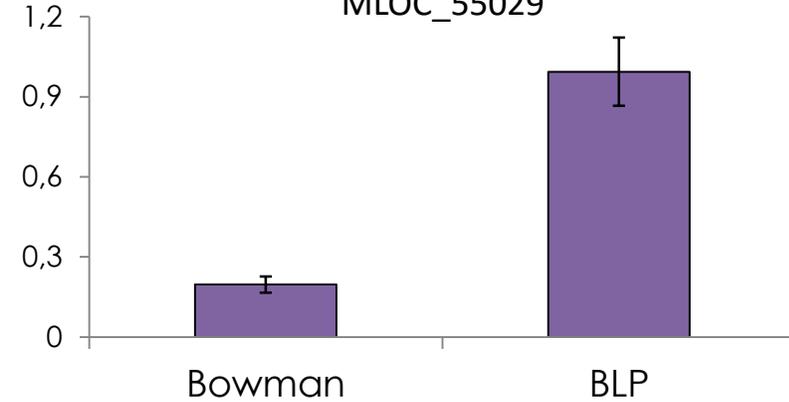
Phenylalanine ammonia-lyase

MLOC_62322



Lipoxygenase B

MLOC_55029

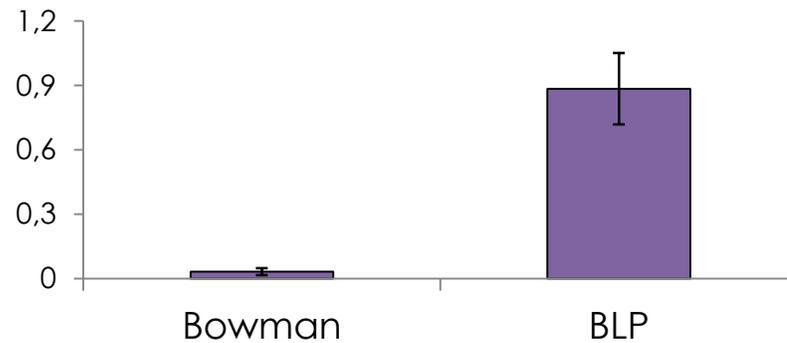


$$\log_2(FC) = -3,97^*$$

$$\log_2(FC) = -8,81^*$$

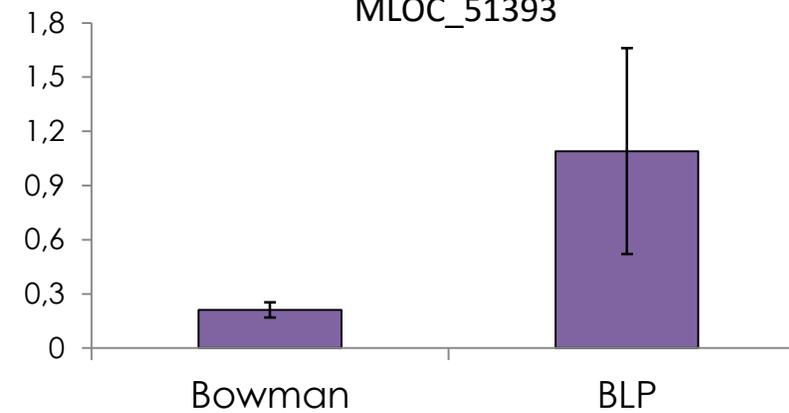
Caffeic acid O-methyltransferase

MLOC_76018



Isoflavone reductase

MLOC_51393

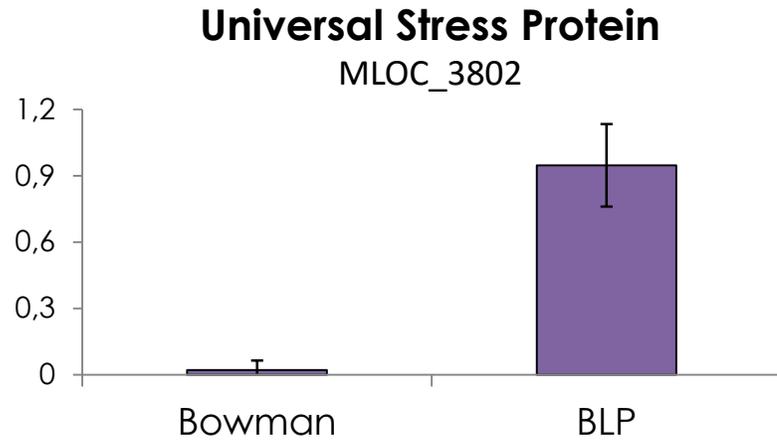


$$\log_2(FC) = -4,14^*$$

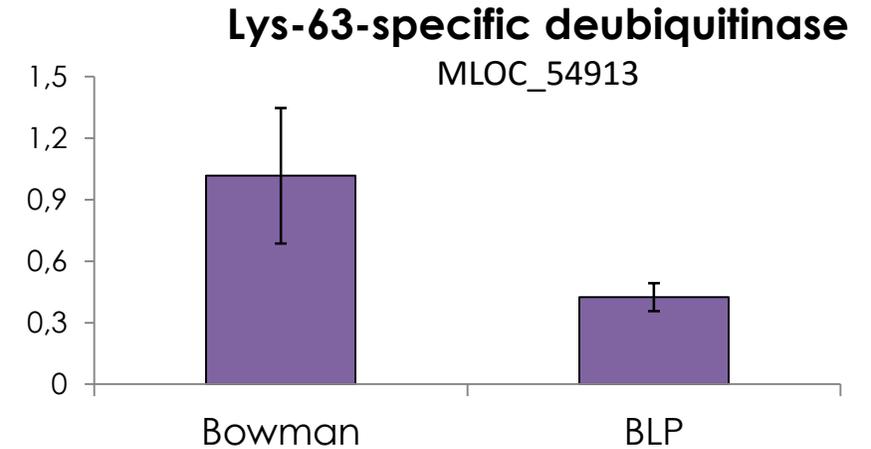
$$\log_2(FC) = -10^*$$

*p-value < 0,05

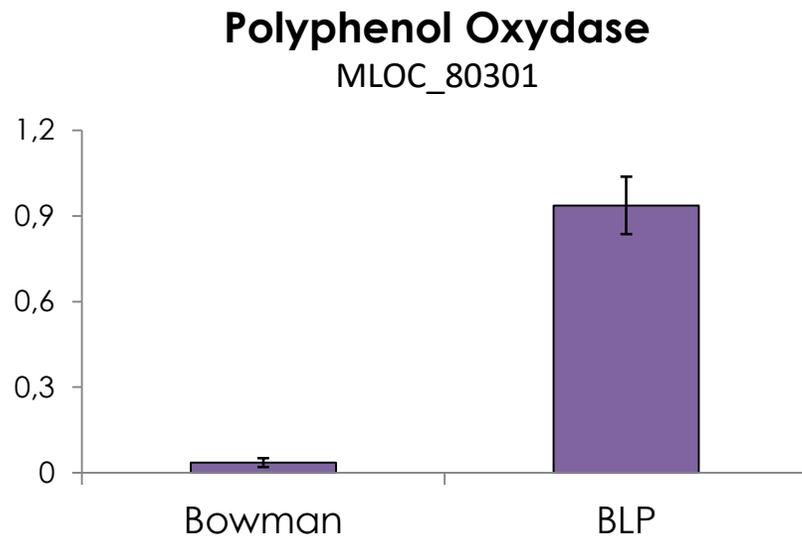
qRT-PCR верификация ДЭГ



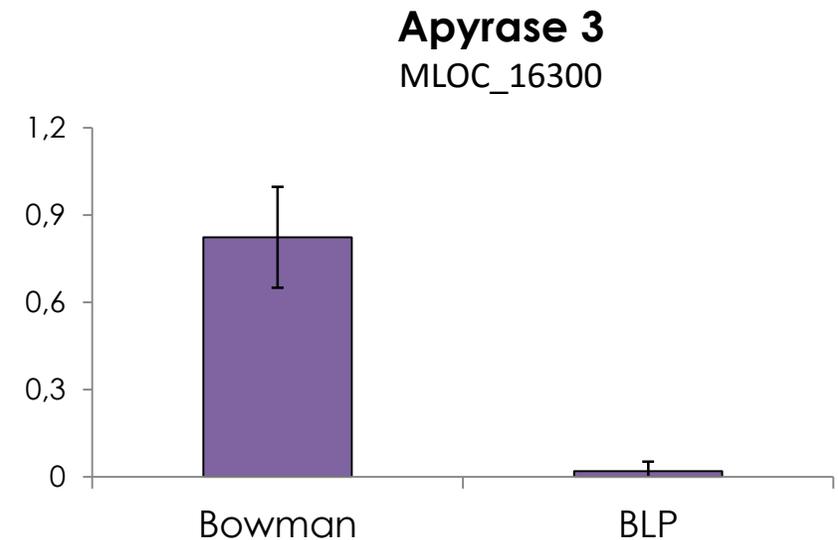
$$\log_2(\text{FC}) = -6,46^*$$



$$\log_2(\text{FC}) = -4,61^*$$



$$\log_2(\text{FC}) = 6,45^*$$



$$\log_2(\text{FC}) = 11,95^*$$

*p-value < 0,05

Метаболические пути, включающие ДЭГ

BLP

>

Bowman

- Биосинтез мономеров суберина
(suberin monomers biosynthesis)
- Биосинтез кутина
(cutin biosynthesis)
- Биосинтез фитоалексинов
(phytoalexins biosynthesis)
- Биосинтез кутикулярных восков
(cuticular wax biosynthesis)
- Биосинтез фенилпропаноидов
(phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions)

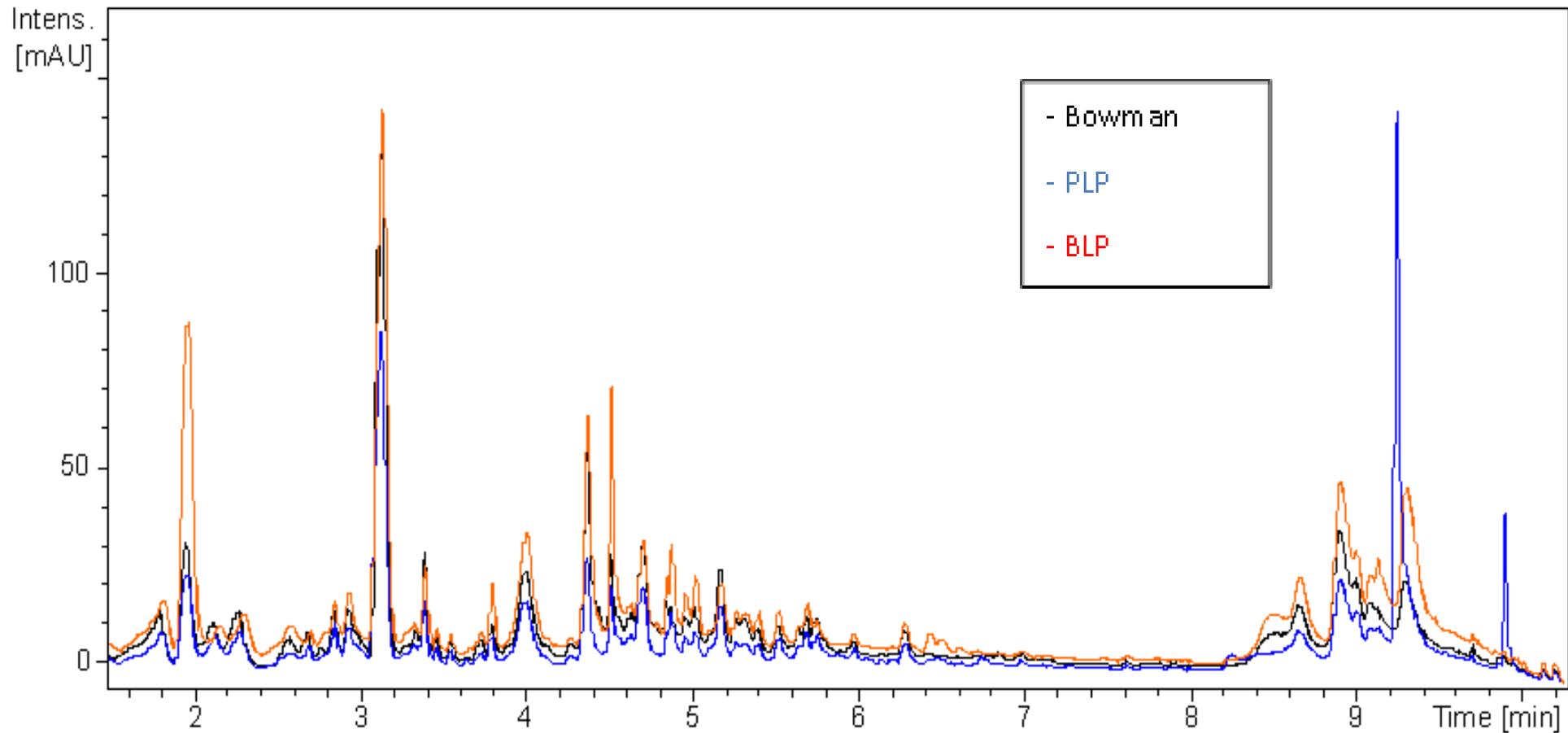
Bowman

>

BLP

- Биосинтез целлюлозы
(cellulose biosynthesis)
- Взаимопревращения
пиримидиновых рибонуклеотидов
(pyrimidine ribonucleotides
interconversion)

Содержание фенольных соединений в изогенных линиях



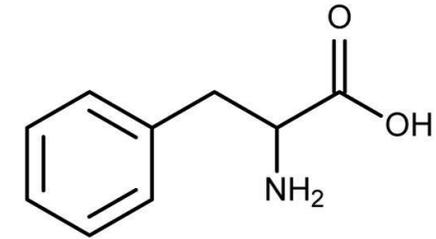
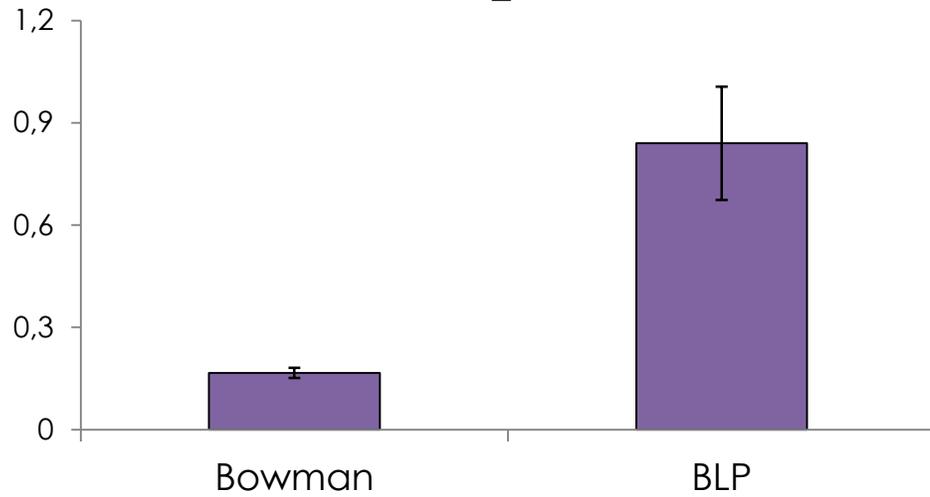
By Dr. H.P.-Mock (IPK-Gatersleben, Germany)

Интерпретация ДЭГ

Черная окраска леммы и перикарпа

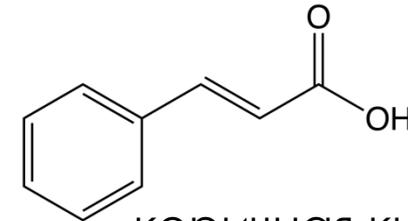
Фенилаланинаммиакиаза (PAL)

MLOC_62322



фенилаланин

↓ PAL



коричная кислота

суберин

ЛИГНИН

флавоноиды

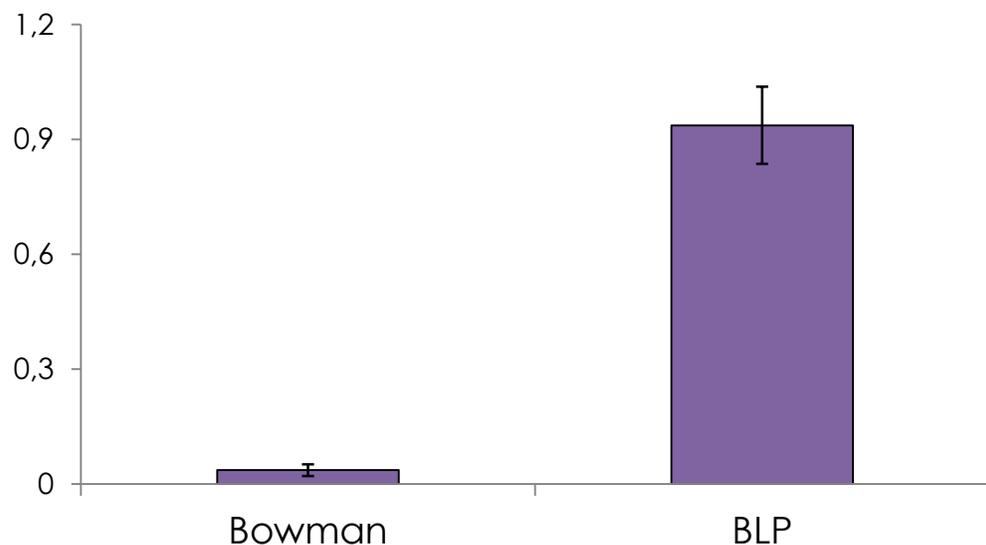
фитоалексины

Интерпретация ДЭГ

Черная окраска леммы и перикарпа

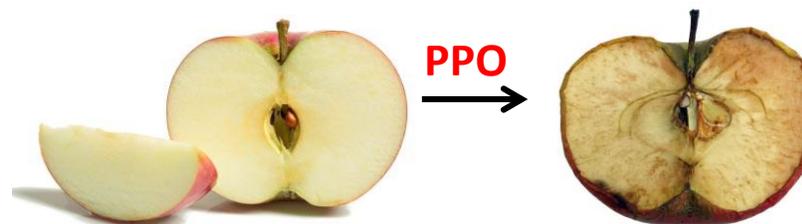
Полифенолоксидаза (PPO)

MLOC_80301

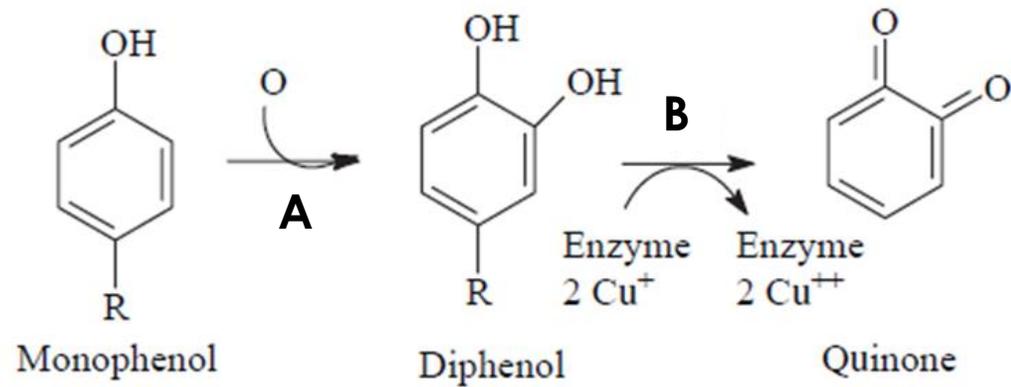


Продукты полимеризации хинонов вызывают потемнение некоторых фруктов и овощей при контакте с воздухом.

PPO катализирует окисление фенолов до хинонов.



Полифенолоксидаза (PPO)

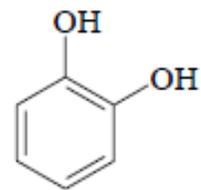


Реакции, осуществляемые полифенолоксидазой:

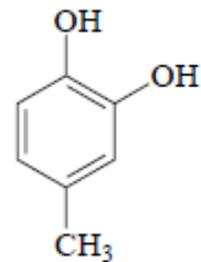
A – гидроксילирование монофенолов

B – окисление фенолов до хинонов

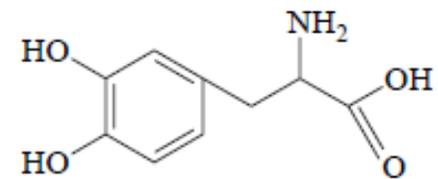
Структуры возможных субстратов для РРО



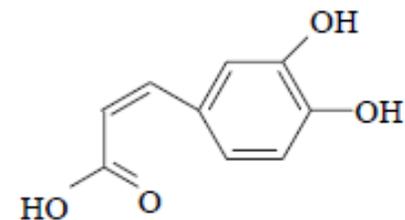
Catechol



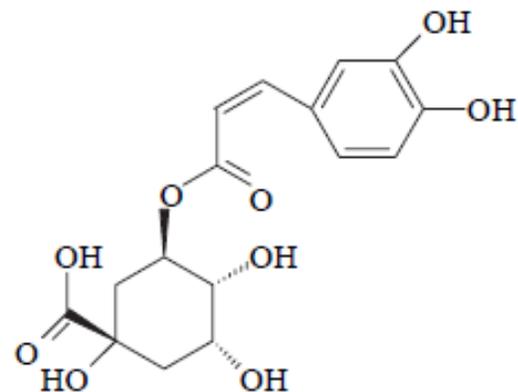
4-Methyl catechol



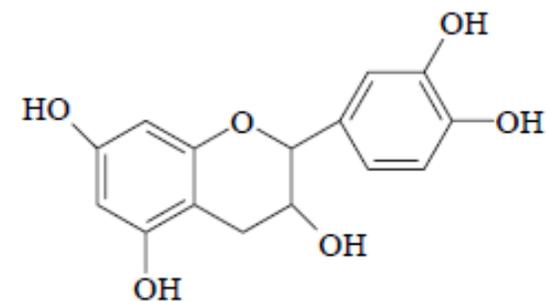
DOPA



Caffeic acid



Chlorogenic acid



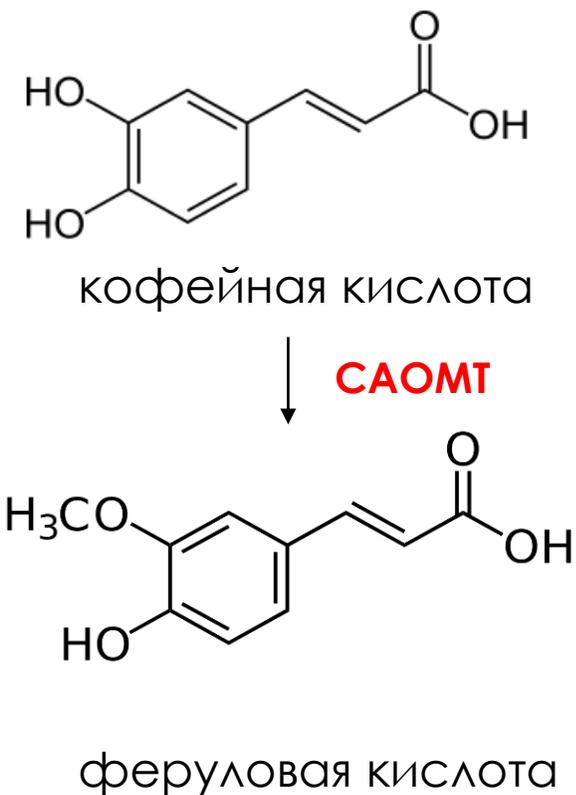
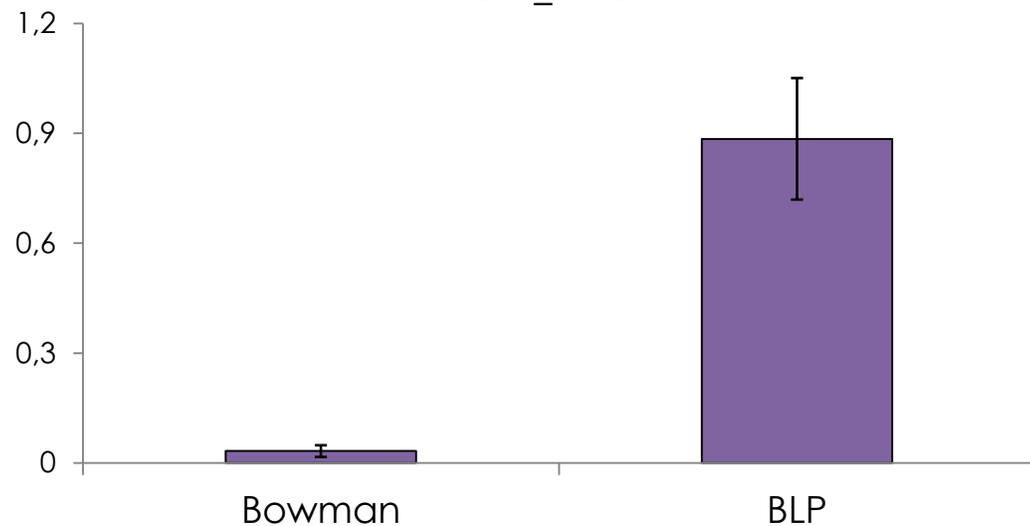
Catechin

Интерпретация ДЭГ

Повышенное содержание антиоксидантов и устойчивость к абиотическому стрессу

О-метилтрансфераза кофейной кислоты

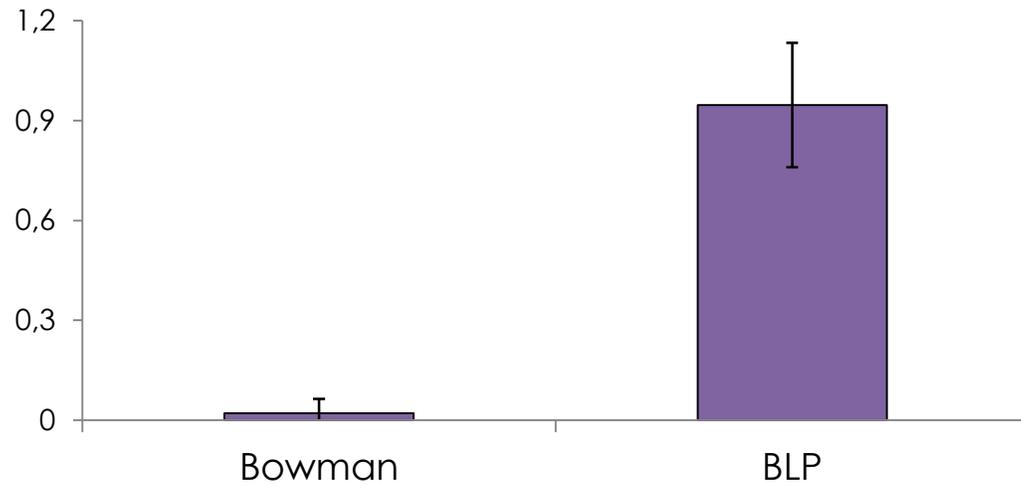
MLOC_76018



Интерпретация ДЭГ

Устойчивость к действию патогенов

**Универсальный белок
стрессового ответа**
MLOC_3802



Плейотропные эффекты локуса *Blp*



RESEARCH

Open Access



Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the *Black lemma and pericarp (Blp)* gene

Anastasiya Y. Glagoleva^{1,2*†}, Nikolay A. Shmakov^{1,2†}, Olesya Y. Shoeva¹, Gennady V. Vasiliev¹, Natalia V. Shatskaya¹, Andreas Börner³, Dmitry A. Afonnikov^{1,2} and Elena K. Khlestkina^{1,2}

From 4th International Scientific Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" (PlantGen 2017) Almaty, Kazakhstan. 29 May - 2 June 2017