Study of the DEEPER ROOTING 1 (DRO1) expression features in the cucumber (*Cucumis sativus*) root system architecture formation

Kiryushkin A.S., Guseva E.D., Ilina E.L., Demchenko K.N.
Komarov Botanical Institute, Saint Petersburg, Russia
E-mail: akiryushkin@binran.ru

Key message. Identification of the cucumber DRO clade in IGT protein family was performed using phylogenetic analysis. Relative expression to the exogenous auxin and promoter tissue activity of the DRO genes were studied.

Keywords: root systems, DRO1, cucumber, lateral root, molecular cloning

Change in the angle of the aboveground and underground lateral organs elevation in monocotyledonous and dicotyledonous plants is regulated by the IGT proteins (named for a conserved three amino acid motif IGT (isoleucine-glycine-threonine)). One of the representatives of the IGT family is the DRO1 protein, which regulates the lateral root angle. The aim of this work is to study the expression features of the gene encoding the DRO1 protein during the cucumber (*Cucumis sativus*, *Cucurbitaceae*) root system architecture formation.

Phylogenetic analysis of the IGT proteins was performed using the MEGA7.0. Data about auxin sensitivity of cucumber DRO genes were obtained using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Study of the cucumber DRO genes expression pattern in various root zones, as well as the assessment of the DRO genes expression domain during lateral root initiation and development were performed using laser scanning confocal microscopy.

Three representatives of the DRO clade were identified in the cucumber proteome using phylogenetic analysis of the Arabidopsis, rice and cucumber IGT proteins. The genes encoding the cucumber DRO proteins were named CsDRO1, CsDRO2 and CsDRO3 according to the percentage of similarity between the amino acid sequences of the cucumber DRO proteins and rice DRO1 protein (OsDRO1). CsDRO1 has 52% identical amino acid sequences. For CsDRO2 the identity was 45%, and for CsDRO3 only 22%. According to preliminary qRT-PCR data three identified cucumber DRO genes are auxin-sensitive. Tissue activity analysis of the cucumber DRO gene promoters showed that their expression pattern was present both in the root apical meristem and in the lateral root primordia initiated directly in the apical meristem of the parental root.

Considering the highest similarity of CsDRO1 protein with OsDRO1 protein, as well as the CsDRO1 expression features in roots, CsDRO1 can be selected as a target gene for further CRISPR/Cas editing in order to change the cucumber root system architecture. The reported study was funded by RFBR, project number 20-316-80046.

Изучение особенностей экспрессии гена DEEPER ROOTING 1 (DRO1) при формировании архитектуры корневой системы огурца (*Cucumis sativus*)

Кирюшкин А.С., Гусева Е.Д., Ильина Е.Л., Демченко К.Н.
Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация: Анализ филогении белков семейства IGT позволил идентифицировать представителей клады DRO у огурца. Для генов DRO огурца анализировали уровни их экспрессии в ответ на экзогенный ауксин, а также тканевую активность их промоторов.

Ключевые слова: корневые системы, DRO1, огурец, боковой корень, молекулярное клонирование

Изменение угла наклона надземных и подземных боковых органов у однодольных и двудольных растений регулируется работой белков семейства IGT, название которого происходит от консервативной аминокислотной последовательности IGT (изолейцин-глицин-треонин), имеющейся у всех белков этого семейства. Одним из представителей семейства IGT является белок DRO1, регулирующий угол наклона бокового корня относительно вертикальной оси родительского корня. Целью данной работы является изучение особенностей экспрессии гена, кодирующего белок DRO1, при формировании архитектуры корневой системы огурца (*Cucumis sativus*, сем. *Cucurbitaceae*).

Филогенетический анализ белков семейства IGT был проведен с помощью программы MEGA7.0. Данные по ауксин-чувствительности генов DRO огурца были получены с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Изучение паттерна экспрессии генов DRO огурца в различных ростовых зонах корня, а также оценка этапа формирования собственного домена экспрессии генов DRO при инициации и развитии бокового корня проводились с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

В результате филогенетического анализа белков семейства IGT *Arabidopsis*, риса и огурца были идентифицированы три представителя клады DRO у огурца. Гены, кодирующие белки DRO огурца, были названы CsDRO1, CsDRO2 и CsDRO3. Номер присваивался исходя из процента сходства между аминокислотными последовательностями белка огурца и белка DRO1 риса (OsDRO1). CsDRO1 обладает 52% идентичных аминокислотных последовательностей. Для CsDRO2 это значение составляло 45%, а для CsDRO3 только 22%. Согласно предварительным данным ПЦР-РВ, все найденные гены DRO огурца являются ауксин-чувствительными. Анализ тканевой активности промоторов идентифицированных генов DRO огурца показал, что при формировании бокового корня их домен экспрессии охватывает как меристему родительского корня, так и формирующиеся в ней примордии бокового корня.

Учитывая наибольший процент сходства белка CsDRO1 с белком OsDRO1, а также особенности экспрессии гена CsDRO1 в корнях огурца, CsDRO1 может быть выбран в качестве гена-мишени для дальнейшего CRISPR/Cas редактирования с целью направленного изменения архитектуры корневой системы огурца.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 20-316-80046-мол_эв_а.