

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ФИЛОГЕНИЯ ПАРАЛОГОВ ФИТОИНСИНТАЗЫ *PSY1* И *PSY2* У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВЫХ КОМПЛЕКСОВ РОДА *CAPSICUM*

© 2020 г. А. В. Щенникова¹, Е. А. Дьяченко¹, Г. И. Ефремов¹, М. А. Филюшин^{1,*}, Е. З. Кочиева¹

Представлено академиком РАН В. О. Поповым

Поступило 01.06.2020 г.

После доработки 04.07.2020 г.

Принято к публикации 04.07.2020 г.

Идентифицированы гомологи генов *PSY1* и *PSY2*, кодирующие изоформы фитоинсинтаз у видов *Capsicum* – *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. tovarii*, *C. eximium* и *C. chacoense*. Выявлен высокий консерватизм функционально значимых областей фитоинсинтаз у анализируемых видов перца. Показано, что кластеризация видов перца только по *PSY1* соответствует традиционной филогении, при этом *C. eximium* входит в комплекс Purple corolla, а *C. chacoense* равноудален от клад *Annuum* и *Baccatum*. Обнаружено отсутствие значимых отличий *PSY1* и *PSY2* желтоплодного *C. chinense* от фитоинсинтаз красноплодных образцов. Определено, что желтая окраска плода *C. chinense* может быть следствием низкой экспрессии *PSY1* и повышенной транскрипции *PSY2*. Таким образом, продемонстрировано, что приобретенная окраска плода сохраняет строгие филогенетические ограничения, однако они могут быть преодолены в результате искусственного отбора на активность фитоинсинтазы *PSY1*.

Ключевые слова: виды *Capsicum*, каротиногенез, эволюция окраски плода перца

DOI: 10.31857/S2686738920060220

Цветовая гамма окраски сочного плода существующих растений менее разнообразна, чем окраска цветков, но при этом очень широка и часто даже превосходит возможности человека по ее восприятию. Одна из наиболее документированных гипотез возникновения и адаптивного значения окраски основана на ее роли в привлечении животных для распространения семян, так как отражательная способность плода, к примеру, в красной части спектра увеличивает хроматический контраст с листьями и позволяет визуально ориентированным птицам обнаружить спелые плоды [1]. Млекопитающие оказывают более слабое избирательное давление, чем птицы, так как используют предпочтительно осязание или обоняние, при этом трихроматическое цветовое зрение (способность отличать красный от зеленого) приматов могло возникнуть как адаптация для обнаружения красных плодов [1].

Две другие известные гипотезы о причинах разнообразия окраски плодов предполагают, что она определяется: (1) филогенетическими ограничениями и строго сохраняется внутри таксономических единиц разного порядка; (2) адаптивной реакцией растения на абиотические факторы, когда отражательная способность плода и листа сходна и обусловлена светоотражающими пигментами [1]. Так, содержание каротиноидов в сочных плодах-ягодах видов *Vaccinium* меняется в зависимости от климатической зоны произрастания, что указывает на важность фотозащиты не только для листьев, но и для плодов [2].

Одной из моделей для исследования адаптивного разнообразия окраски плода может служить перец *Capsicum*, который относится к семейству Solanaceae и объединяет более 35 видов [3]. Пять видов *Capsicum* одомашнены и культивируются во всем мире (*C. annuum*, *C. chinense* и *C. frutescens*) или преимущественно в Латинской Америке (*C. pubescens* и *C. baccatum*). Эти и еще несколько близкородственных видов образуют отдельную филогенетическую кладу, представители которой отличаются от других видов *Capsicum* количеством хромосом ($2n = 24$) и красной окраской плода [3]. Плоды дикорастущих образцов этих видов распространяются исключительно птицами

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

[4]. Спелые плоды сортов перца, благодаря влиянию доместикиции и искусственного отбора, кроме традиционно красной, могут иметь желтую, оранжевую, розовую, цвета слоновой кости и фиолетовую окраску [5]. Пигментация определяется содержанием и соотношением каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов, при этом в незрелых плодах доминируют хлорофиллы, а в спелых — каротиноиды [5].

Каротиноиды представляют собой группу разнообразных природных пигментов, которые участвуют в фотосинтезе и выработке фитогормонов и сигнальных молекул для роста, развития и защиты растений [2, 6]. Биосинтез каротиноидов осуществляется на мембранах пластид — хлоропластов, хромопластов и амилопластов [5]. В процессе созревания плода перца хлоропласты замещаются хромопластами, в которых формируются глобулы для накопления синтезируемых каротиноидов, и плод начинает менять зеленую окраску на желтую, оранжевую или красную в зависимости от соотношения типов каротиноидов [7]. В красных плодах перца каротиногенез идет от образования ксантофиллов — капсантина и капсорубина [8].

Первым этапом синтеза каротиноидов является конденсация двух молекул геранилгеранилпирофосфата при участии фитоинсиназы PSY с образованием фитоина в активном центре PSY [7]. Накопление и активность PSY в хромопластах модулируются на посттрансляционном уровне шаперонными белками Orange и Hsp70 в координации со стромальным Clp-протеазным комплексом [7].

У растений известно от одной до трех изоформ PSY, гены которых различаются по специфичности их транскрипции к различным органам и тканям, а также ролью в процессах развития [6]. У сортов *Capsicum* на сегодняшний день известно две изоформы с преимущественной локализацией в пластидах листа (PSY2) и плода (PSY1) [5, 8]. Предполагается, что начало использования первичных каротиноидов в качестве вторичных метаболитов было адаптивным для многих видов [9]. Конвергентные дубликации гена PSY, специфичного для фотосинтезирующих тканей, с последующей диверсификацией функции могли способствовать эволюции тканеспецифичного каротиногенеза, индивидуального как для фотосинтезирующих, так и для нефотосинтезирующих органов [9].

Целью данного исследования стала идентификация и характеристика генов PSY1 и PSY2, кодирующих две изоформы фитоинсиназы у видов *Capsicum*, включая оценку их межвидовой вариативности и филогении. В работе были использованы образцы шести видов *Capsicum* — одомашненных *C. baccatum* (сорт Визирь), *C. chinense*

(сорт Жгучий король) и *C. frutescens* (сорт Tabasco), и дикорастущих *C. tovarii*, *C. eximium* и *C. chacoense* (табл. 1). Данные виды охватывают пять из шести выделяемых субклад красноплодных перцев. Зрелые плоды выбранных образцов имеют красную окраску, за исключением образца *C. chinense* сорт Жгучий король, спелый плод которого темно-желтый.

Последовательности гомологов PSY1 и PSY2 амплифицировали на геномной ДНК образцов анализируемых видов с ранее разработанными нами праймерами (CaPSY1F 5'-TCAGAATGTCTGTTGCCTTG-3', CaPSY1R 5'-TCCTGATTTTCATGTTCTTGTAGA-3'; CaPSY2F 5'-AGCATGTCTGTTGCTTTGTTG-3', CaPSY2R 5'-CTTCATTCATGTCCTTTGYTAGTG-3')

(полимераза LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase, New England Biolabs, USA; условия: 94°C 10 мин, 36 циклов (94°C 40 с, 56°C 40 с, 65°C 4 мин), 65°C 7 мин). Полученные последовательности секвенировали (ABI Prism 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA) и анализировали (MEGA 7.0, <https://www.megasoftware.net/>, NCBI-CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; PROVEAN, <http://provean.jcvi.org/>).

Для каждого из исследуемых видов перца были определены полногеномные последовательности (начиная с ATG) PSY1 и PSY2, полиморфизм которых оценивали в сравнении с *C. annuum* (cv. Zunla 1) PSY1 (Gene ID: 107868281) и PSY2 (Gene ID: 107859651). Кроме идентифицированных PSY1 и PSY2 видов перца, из NCBI с помощью BLAST-н были извлечены геномные последовательности PSY1 и PSY2 *C. baccatum* (isolate PBC81) и *C. chinense* (isolate PI159236). Также, для сравнительного анализа были использованы полученные ранее последовательности PSY1 и PSY2 видов *C. chinense* (сорт Pimenta da Neyde) и *C. frutescens* (сорт Самоцвет).

Размер генов PSY1 и PSY2 варьировал (табл. 1), и между собой гомологи различались 142 (5.90%) и 107 (3.57%) SNPs, четверть которых — 38 (26.76%) и 26 (24.30%) — находилась в кодирующей части PSY1 и PSY2, состоящей из 6 экзонов. Самыми вариабельными оказались экзоны I и III у PSY1 — 20 и 11 (52.63% и 28.95% всех экзонных замен) и I и VI у PSY2 — 14 и 8 (53.85% и 30.77%).

Кодируемые белки PSY1 и PSY2 исследуемых видов перца имели размер 419 и 432 а. о., соответственно, кроме PSY2 *C. tovarii* и *C. frutescens* сорт Tabasco (431 а. о.) (табл. 1). Все они входили в суперсемейство ферментов биосинтеза изопреноидов и содержали консервативный домен head-to-head (HH)-IPPS (PSY1, 81–418 а. о.; PSY2, 86–435 а. о.) с функционально значимыми участками, не имеющими каких-либо полиморфизмов (рис. 1). На N-конце белков был предсказан транзитный пептид с инвариантным сайтом расщеп-

Таблица 1. Характеристики гомологов генов *PSY1* и *PSY2* у видов *Capsicum*

Вид <i>Capsicum</i> (сорт/ NCBI ID/ каталожный номер)	Ген	Ген/кДНК (п. н.)/ белок, а. о.	Замещения а. о.**	PSY2 vs. PSY1***	
				общие	специфические
<i>C. baccatum</i> L. (PBC81; CM008446.1:19444825-19449400 / CM008444.1:141318038-141337266)*	<i>PSY1</i>	2846/1260/419	V40G, C59W, R91Q, D194G	A92T, V93M, K105R, D119E, P124K, V127P, L128I, N131T, G143S, L158M, D163E, R166K, Q193A, I205V, R224K, V236I, W224R, M249L, I315V, G329D, Q358E, A364T, S368A, K383R, R398K, L409I, T410A, R417K, P422-S427del, L429del	E121D, A200G
	<i>PSY2</i>	2994/1299/432	V15F, G60D, D65G, Q113H		E121D, A200G
	<i>PSY1</i>	2846/1260/419	V40G, R91Q, D194G		E121D
<i>C. chinense</i> Jacq. (PI159236; CM008434.1:12099868-12105776 / CM008432.1:150147614-150156089)*	<i>PSY1</i>	2844/1260/419			E121D
	<i>PSY2</i>	2998/1299/432			E121D
<i>C. chinense</i> Jacq. (Pimenta da Neyde / MT313936; MT313941)	<i>PSY1</i>	2885/1260/419			E121D
	<i>PSY2</i>	2998/1299/432			E121D
<i>C. chinense</i> Jacq. (Жгучий король / MT507261; MT507267)	<i>PSY1</i>	2844/1260/419	D13E, R62G		E121D
	<i>PSY2</i>	2998/1299/432	M39T, M249L, T430A		E121D
<i>C. frutescens</i> L. (Tabasco / MT507262; MT507268)	<i>PSY1</i>	2858/1260/419	D13E, R62G		S219C
	<i>PSY2</i>	2991/1296/431	M39T, S426C		S219C
<i>C. frutescens</i> L. (Самоцвет / MT313935; MT313940)	<i>PSY1</i>	2844/1260/419	A40G, C59W		E121D
	<i>PSY2</i>	2985/1299/432	M39T, N186T, T430A		E121D
<i>C. tovarii</i> Eshbaugh, P.G.Smith & Nickrent (MT507260; MT507266)	<i>PSY1</i>	2858/1260/419	V40G, C59W, T65S, R91Q, D115E, S213C		S219C
	<i>PSY2</i>	2991/1296/431	G60D, D65G, S428del		S219C
<i>C. eximium</i> Hunz. (MT507263; MT507269 / TGRC cat. # 21502)	<i>PSY1</i>	2857/1260/419	V40G, R91Q, A187T		E121D, Q193T
	<i>PSY2</i>	2980/1299/432	T430A		E121D, A334S
<i>C. chacoense</i> Hunz. (MT507264; MT507270 / TGRC cat. # 21572)	<i>PSY1</i>	2841/1260/419	R91Q, A328S		E121D, A334S
	<i>PSY2</i>	2962/1299/432	G60D, D65G, A390S		E121D, A334S

Примечание: * NCBI; ** в сравнении с *C. annuum* (Zunla 1); *** замещения а. о. внутри HH-IPPS; полужирный шрифт – радикальные замещения а. о.

ления (PSY1 – V/Q, 74 а. о., PSY2 – V/N, 80 а. о.) (рис. 1), ответственный за транслокацию ферментов в пластиды [10]. Белки PSY1 и PSY2 содержали 13 и 12 замещений а. о. соответственно (табл. 1). Последовательности PSY1 были идентичны PSY2 на 82%; основные различия заключались в двух вставках (S₅₈LNAG(D)LR_Y₆₅; S₄₂₆SS(-)LAK(N)T₄₃₂) у PSY2 и одной (D₃₂SS₃₄) – у PSY1 (рис. 1).

Выявленный консерватизм функционально-значимых участков предполагает корректный фолдинг зрелой части всех идентифицированных фитоинсинтаз PSY1 и PSY2 видов перца, а также способность взаимодействовать с правильными белковыми партнерами и осуществлять предписанные каталитические функции. Сопоставимое количество замещений а. о. в последовательностях PSY1 и PSY2 предполагает ко-эволюцию генов, кодирующих эти изоформы, а N-концевые индели в области транзитного пептида PSY1 и PSY2 могут определять специфичность транслокации ферментов (хлоропласты или хромопласты).

Между консервативными доменами анализируемых гомологов PSY1 и PSY2 было найдено 33 замещения а. о. и две делеции, в том числе замещения, специфичные (в сравнении с *C. annuum*) для образцов вида *C. baccatum* (A200G) и для всех анализируемых образцов (E121D), за исключением *C. frutescens* (Tabasco) и *C. tovarii*. Ранее для видов и сортов томата было показано, что существуют два замещения а. о., которые определяют различия в уровне активности между фитоинсинтазами PSY1 и PSY2, а именно, замещения N136Y и G198A в последовательности PSY1 приводили к существенному росту активности фермента, которая становилась сопоставима с эффективностью PSY2 [10]. Кроме того, остаток фенилаланина F₁₃₅ по соседству с тирозином Y₁₃₆ значительно повышал каротиногенную активность PSY2 томата [10]. Интересно, что все исследуемые гомологи не только PSY2, но и PSY1 видов перца, имели в позиции, соответствующей N136Y томата, остаток тирозина, соседствующий с фенилаланином (F₁₄₇Y₁₄₈ и F₁₅₃Y₁₅₄, соответственно), а в позиции, соответствующей G198A томата, – остаток аланина (A₂₁₀ и A₂₁₆ соответственно) (рис. 1). Это подтверждает то, что мутация Y136N могла возникнуть у PSY1 томата при эволюционном разделении родов *Capsicum* и *Solanum*, которое произошло предположительно 19 млн лет назад [11], и до расхождения генома томата и картофеля [10]. Также, это говорит о том, что эффективность фитоинсинтаз PSY1 и PSY2 видов перца в каротиногенезе может иметь сопоставимый уровень, что должно обеспечивать не только достаточную фотозащиту растений, но и высокое содержание каротиноидов в перикарпе плода перца и соответствующую яркую окраску.

Был проведен филогенетический анализ, основанный на сравнении кодирующих последовательностей PSY1 и PSY2 видов *Capsicum* в сравнении с другими видами растений. На полученной дендрограмме отдельные клады сформировали PSY-последовательности *Amborella trichopoda* (обширного предшественника всех двудольных) и однодольных *Zea mays* и *Oryza sativa* (рис. 2). Гомологи PSY1 и PSY2 Solanaceae сгруппировались в два больших кластера, базальную ветвь к которому занял PSY *Arabidopsis thaliana* (рис. 2). Внутри каждого кластера виды Solanaceae легли в соответствии с филогенией основных родов [11].

Примечательно, что образцы видов перца только в случае PSY1 разместились на дендрограмме в соответствии с показанной для них ранее филогенией [12, 13] (рис. 2). Это может быть связано с тем, что классификация видов перца основана большей частью на морфологических характеристиках, в том числе плода, с окраской которого связана активность PSY1 [3]. В PSY1-кластере базальная ветвь представлена *C. eximium*, относящимся к кладе Purple corolla. Далее следует *C. tovarii* (Tovarii clade), объединившийся с *C. frutescens* (сорт Tabasco). Самый эволюционно молодой – субкластер, состоящий из группы образцов клад Vaccatum, Annuum (*C. annuum*, *C. frutescens* (Самоцвет) и *C. chinense*), и вида *C. chacoense* (рис. 2).

В случае PSY2 базальная ветвь также представлена *C. eximium*, при этом кластеризации образцов по видам и кладам не наблюдается (рис. 2).

Расположение *C. eximium* на дендрограмме (кластер PSY1) соответствует работам, в которых *C. eximium* считается отдельным видом или входит в комплекс Purple corolla вместе с видами *C. pubescens*, *C. cardenasii* и *C. tovarii* [3] (рис. 2).

Интересно расположение вида *C. chacoense* между образцами клад Annuum и Vaccatum (рис. 2). Существуют разные мнения по поводу филогении *C. chacoense*. Так, этот вид считают наиболее близким кладам Purple corolla или Vaccatum, либо приписывают равное родство с Annuum, Vaccatum и Pubescens и говорят о том, что *C. chacoense* может быть предшественником трех основных групп *Capsicum* [3]. Полученная нами дендрограмма наиболее согласуется с последней гипотезой.

Ранее было показано, что видам клады Annuum соответствует непропорционально большое количество генов, прошедших позитивную селекцию в процессе диверсификации рода *Capsicum*, что, вероятно, отражает сотни лет искусственного отбора, которым подвергались эти виды, в том числе, для улучшения качественных характеристик плода, включая окраску [3, 5]. В изучаемую выборку образцов видов, которые в норме должны формировать красные плоды, был включен желтоплодный образец – *C. chinense*

Cbac_P2	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cchl_P2	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cfru_Tab_P2	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cctv_P2	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Ccbx_P2	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cchl_P1	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cfru_Tab_P1	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cctv_P1	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cexl_P1	MSVALLWVSNSEVSNNGTGF	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*
Cbac_P2	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cchl_P2	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cfru_Tab_P2	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cctv_P2	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Ccbx_P2	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cchl_P1	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cfru_Tab_P1	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cctv_P1	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cexl_P1	TDDLEVKPDI	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*
Cbac_P2	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cchl_P2	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cfru_Tab_P2	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cctv_P2	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Ccbx_P2	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cchl_P1	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cfru_Tab_P1	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cctv_P1	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cexl_P1	EGMRMDLWKSRYN	260	↓	280	*	300	↓	320	*	340	*	360	*
Cbac_P2	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cchl_P2	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cfru_Tab_P2	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cctv_P2	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Ccbx_P2	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cchl_P1	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cfru_Tab_P1	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cctv_P1	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*
Cexl_P1	DOAEKGVAE	380	↓	400	*	420	*	440	*	460	*	480	*

Рис. 1. Сравнительное выравнивание последовательностей идентифицированных гомологов PSY1 и PSY2 образцов видов *Carpiscium*. P1 – PSY1, P2 – PSY2, Cex1 – *C. eximium*, Ctov – *C. tovarii*, Ccha – *C. chacoense*, Cchl – *C. chinense* (Жучий король), Cfru_Tab – *C. fritescens* (Tabasco), Ccbac – *C. baccatum* (Визирь). Розовый фон – аспаргат-богатые субстрат Mg²⁺-связывающие сайты (DXXXD), светло-зеленый – активный сайт, синие и красные стрелки – каталитические а. о. и субстрат-связывающие карманы, зеленая стрелка – сайт расщепления транзитного пептида, рамкой – остатки, важные для уровня активности PSY1 и PSY2.

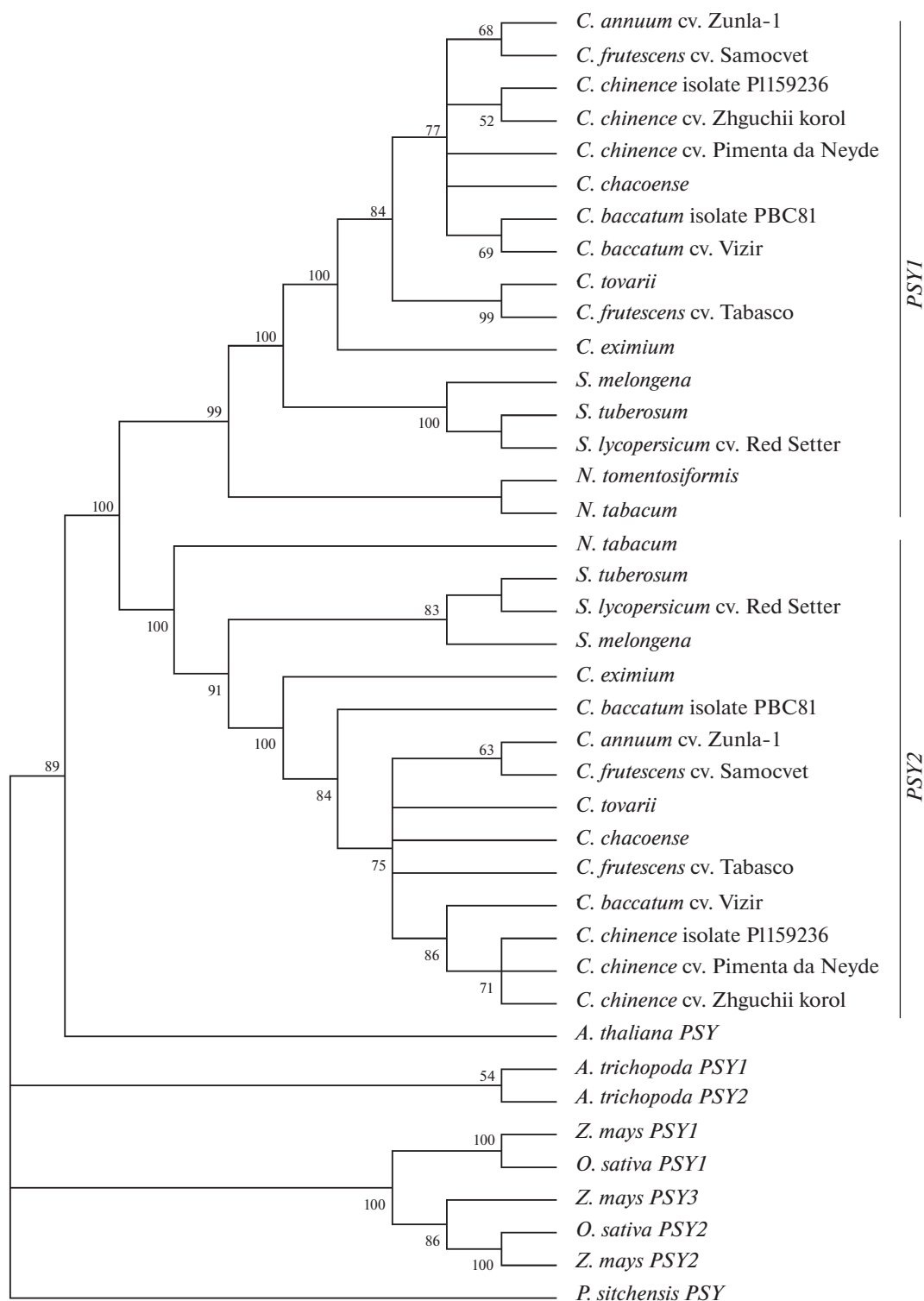


Рис. 2. Филогения видов перца, основанная на кодирующих последовательностях гомологов *PSY1* и *PSY2*, изучаемых образцов видов перца (MEGA 7.0, метод ближайших соседей, модель Kimura 2, бутстрэп 1000). Для сравнения использованы последовательности *PSY1* и *PSY2* *C. annuum* cv. Zunla-1 (NC 029980.1:c205334820-205328571; NC 029978.1:142877052-142881261), *C. chinense* isolate PI159236 (CM008434.1:12099868-12105776; CM008432.1:150147614-150156089), *C. baccatum* isolate PBC81 (CM008446.1:19444825-19449400; CM008444.1:141318038-141337266), *Solanum melongena* (RGBGZ01079994.1; RGBGZ01072332.1), *S. tuberosum* (XM 006343240.2; XM 015309093.1), *S. lycopersicum* cv. Red Setter (EF534740.1; EU021055.1), *Nicotiana tomentosiformis* (XM 009588947.3), *N. tabacum* (XM 016644373.1; HM345582.1), *Arabidopsis thaliana* (NM 001343484.1), *Amborella trichopoda* (XM 006853316.3, XM 011629187.2), *Zea mays* (NM 001114652.2; NM 001114645.1; XM 020541422.1), *Oryza sativa* (AJ715786.1; AK073290.1), *Picea sitchensis* (EF676374.1).

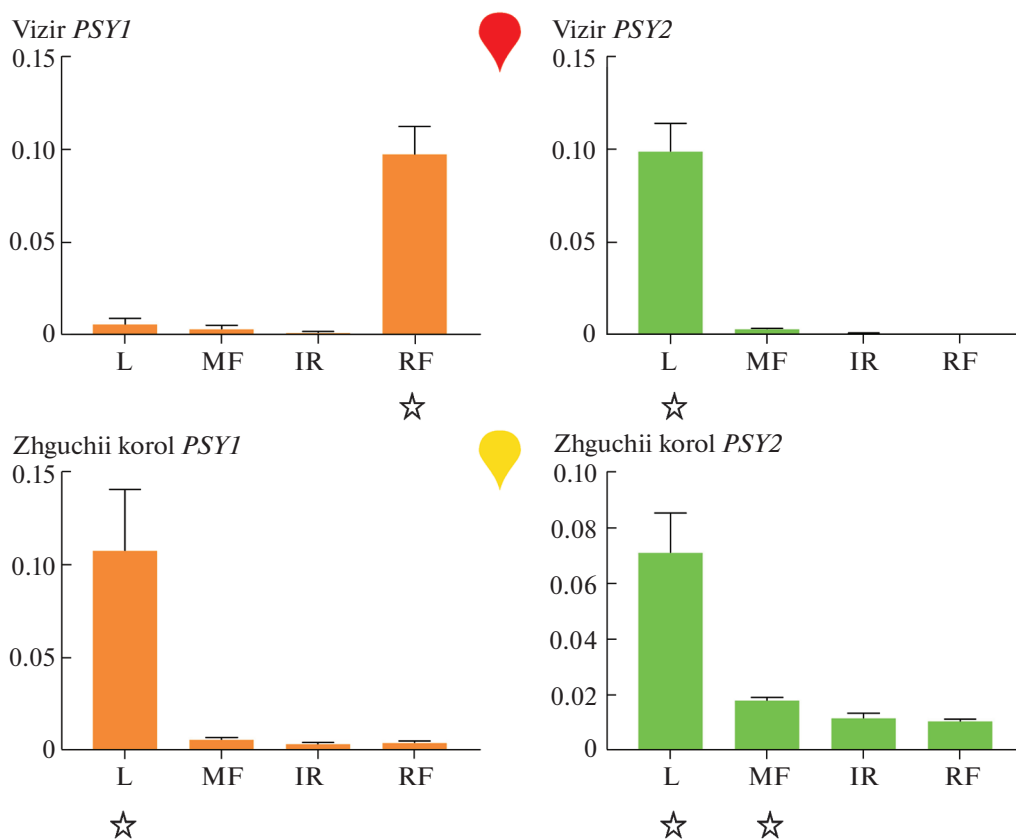


Рис. 3. Профиль экспрессии *PSY1* и *PSY2* в листьях (L) и плодах (неспелых (MF); бланжевых (IR); спелых (RF)) образцов видов *C. chinense* (сорт Жгучий король) и *C. baccatum* (Визирь). Значения транскрипции генов, достоверно различающиеся ($p_{\text{value}} < 0.05$) от такового во всех других тканях одного образца, отмечены звездочками.

(Жгучий король). Анализ *PSY1* и *PSY2* *C. chinense* показал отсутствие каких-либо значимых структурных отличий от фитоинсинтаз красноплодных образцов.

Оценка содержания хлорофиллов и каротиноидов (проведена согласно [8]) в перикарпе плода желтоплодного *C. chinense* и красноплодного *C. baccatum* (Визирь) показала, что суммарные количества хлорофиллов/каротиноидов в неспелых зеленых плодах этих образцов сопоставимы — 36.69/12.02 и 38.17/10.44 мкг/г сырой массы соответственно. В спелых плодах *C. baccatum*/*C. chinense* содержание хлорофиллов значительно снизилось (1.52/4.60 мкг/г), в то время как содержание каротиноидов в красных плодах *C. baccatum* повысилось в 5 раз (51.05 мкг/г), а в желтых плодах *C. chinense* (13.63 мкг/г) не изменилось.

Определение профиля экспрессии *PSY1* и *PSY2* (проведено согласно [8]) в перикарпе неспелых и спелых плодов образцов *C. baccatum* и *C. chinense* обнаружило транскрипты обоих генов во всех анализируемых тканях (рис. 3).

В спелом плоде уровень экспрессии *PSY1* был значительно выше (~в 10 раз) у *C. baccatum* в сравнении с *C. chinense*, тогда как для *PSY2* наблюда-

лась противоположная картина. Можно предположить, что темно-желтая окраска плода *C. chinense* вызвана пониженным уровнем экспрессии *PSY1* и повышенной транскрипцией *PSY2*, для которого ранее была показана способность частично возмещать дефицит *PSY1* в хромопластах [14]. Замена традиционной для вида красной пигментации спелого плода на желтую наглядно демонстрирует последствия искусственной селекции сортов перца и может быть приобретенным следствием различий в транскрипционной или посттрансляционной регуляции активности *PSY1*, как это было показано для томата [5, 7].

Адаптационная эволюция видов перца связана со способностью растения к защите от фотостресса в фотосинтезирующих тканях, в том числе за счет каротиноидов как первичных метаболитов, синтез которых опосредован *PSY2* [1, 3]. Дальнейшая эволюция видов перца направлена на повышение эффективности распространения семян, с чем связано приобретение плодами красной окраски и использования каротиноидов как накапливаемых вторичных метаболитов [1, 3]. Появление вторичного каротиногенеза перца может быть связано с дупликацией *PSY*- предше-

ственника и неофункционализацией дубликата – гена *PSY1*, кодирующего изоформу фитоинсинтазы, специфичную для хромoplastов. В пользу данного предположения говорит полученная нами филогения видов *Capsicum*, где современной таксономии соответствует разделение, основанное именно на *PSY1*, но не на *PSY2*. Таким образом, приобретенная окраска плода сохраняет строгие филогенетические ограничения, однако искусственный отбор (селекция сортов одомашненных видов) может преодолеть их, в том числе с помощью изменения активности *PSY1*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (№ 19-16-00016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valenta K., Kalbitzer U., Razafimandimby D., et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14302.
2. Karppinen K., Zoratti L., Sarala M., et al. // BMC Plant Biol. 2016. V. 16. Article 95.
3. Carrizo García C., Barfuss M.H., Sehr E.M., et al. // Ann. Bot. 2016. V. 118. P. 35–51.
4. Levey D.J., Tewksbury J.J., Cipollini M.L., Carlo T.A. // Oecologia. 2006. V. 150. P. 61–68.
5. Berry H.M., Rickett D.V., Baxter C.J., et al. // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 2637–2650.
6. Stauder R., Welsch R., Camagna M., et al. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 255.
7. D'Andrea L., Rodriguez-Concepcion M. // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 1071.
8. Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 6. С. 644–653.
9. Busch M., Seuter A., Hain R. // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 439–453.
10. Cao H., Luo H., Yuan H., et al. // Plant Physiol. 2019. V. 180. P. 1988–2003.
11. Särkinen T., Bohs L., Olmstead R.G., Knapp S. // BMC Evol. Biol. 2013. V. 13. Article 214.
12. González-Pérez S., Garcés-Claver A., Mallor C., et al. // PLoS One. 2014. V. 9. Article e116276.
13. Lee H.Y., Ro N.Y., Jeong H.J., et al. // BMC Genet. 2016. V. 17. Article 142.
14. Jang S.J., Jeong H.B., Jung A., et al. // J. Exp. Bot. 2020. Article eraa155.

VARIABILITY AND PHYLOGENY OF THE PEPPER PHYTOENE SYNTHASE PARALOGS *PSY1* AND *PSY2* IN SPECIES OF VARIOUS *CAPSICUM* COMPLEXES

A. V. Shchennikova^a, E. A. Dyachenko^a, G. I. Efremov^a, M. A. Filyushin^{a, #}, and E. Z. Kochieva^a

^a Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: michel7753@mail.ru

Presented by academician of the RAS V. O. Popov

Genes homologous to *PSY1* and *PSY2* were identified that encode phytoene synthase isoforms in *Capsicum* species *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. tovarii*, *C. eximium*, and *C. chacoense*. High conservatism of functionally significant sites of phytoene synthases of the analyzed accessions was revealed. It was found that only *PSY1*-based clustering of pepper species corresponds to the traditional *Capsicum* phylogeny; *C. eximium* was a part of the Purple corolla complex, and *C. chacoense* was equidistant from Annuum and *Baccatum* clades. The absence of significant differences between *PSY1* and *PSY2* of yellow-fruited *C. chinense* and red-fruited pepper accessions was shown. The yellow colour of *C. chinense* fruit was thought to be the result of both decreased *PSY1* expression and increased *PSY2* transcription. Thus, it was demonstrated that the acquired fruit pigmentation retains strict phylogenetic limitations, which, however, can be overcome by artificially selecting for the activity of phytoene synthase *PSY1*.

Keywords: *Capsicum* species, carotenogenesis, evolution of the pepper fruit colour