

УДК 577.214.5:575.174.015.3

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИВЕРСИФИКАЦИЯ КАРОТИНОИД-ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРАЗ CrtISO, CrtISO-L1 И CrtISO-L2 У ВИДОВ ТОМАТА (*SOLANUM*, СЕКЦИЯ LYCOPERSICON)

© 2023 г. Г. И. Ефремов<sup>1,\*</sup>, А. В. Щенникова<sup>1</sup>, Е. З. Кочиева<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 13.09.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принято к публикации 06.10.2022 г.

Исследована экспрессия генов каротиноид-цис-транс-изомераз *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в сравнении с содержанием каротиноидов у видов томата с разной окраской спелого плода: зеленая (*Solanum habrochaites*), желтая (*S. cheesmaniae*) и красная (*S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*). Показано более древнее происхождение *CrtISO-L2* по отношению к *CrtISO* и *CrtISO-L1*. Выявлено сходное содержание суммарных каротиноидов (листья) и  $\beta$ -каротина (спелые плоды) между образцами. В отличие от плодов *S. habrochaites* и *S. cheesmaniae*, красные плоды накапливали ликопин и в 20–30 раз больше суммарных каротиноидов. Самый высокий уровень транскриптов и в листьях, и в спелых плодах – у *CrtISO*. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* транскрибировались высоко в листьях и низко в плодах, за исключением высокой экспрессии *CrtISO-L2* в плодах *S. lycopersicum*. Зависимость содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов в плоде отсутствовала. В листьях показана положительная корреляция суммы каротиноидов с уровнем транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2*.

**Ключевые слова:** виды томата, *Solanum*, каротиногенез, каротиноид-цис-транс-изомеразы, эволюция окраски плода томата

**DOI:** 10.31857/S2686738922600686, **EDN:** МОКОФР

### ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды являются вторичными метаболитами и объединяют более 700 соединений с разнообразными биологическими функциями, касающимися взаимодействия организма с окружающей средой [1]. Их возникновение связывают с археями и бактериями, где каротиноиды играют роль стабилизаторов клеточных мембран [1].

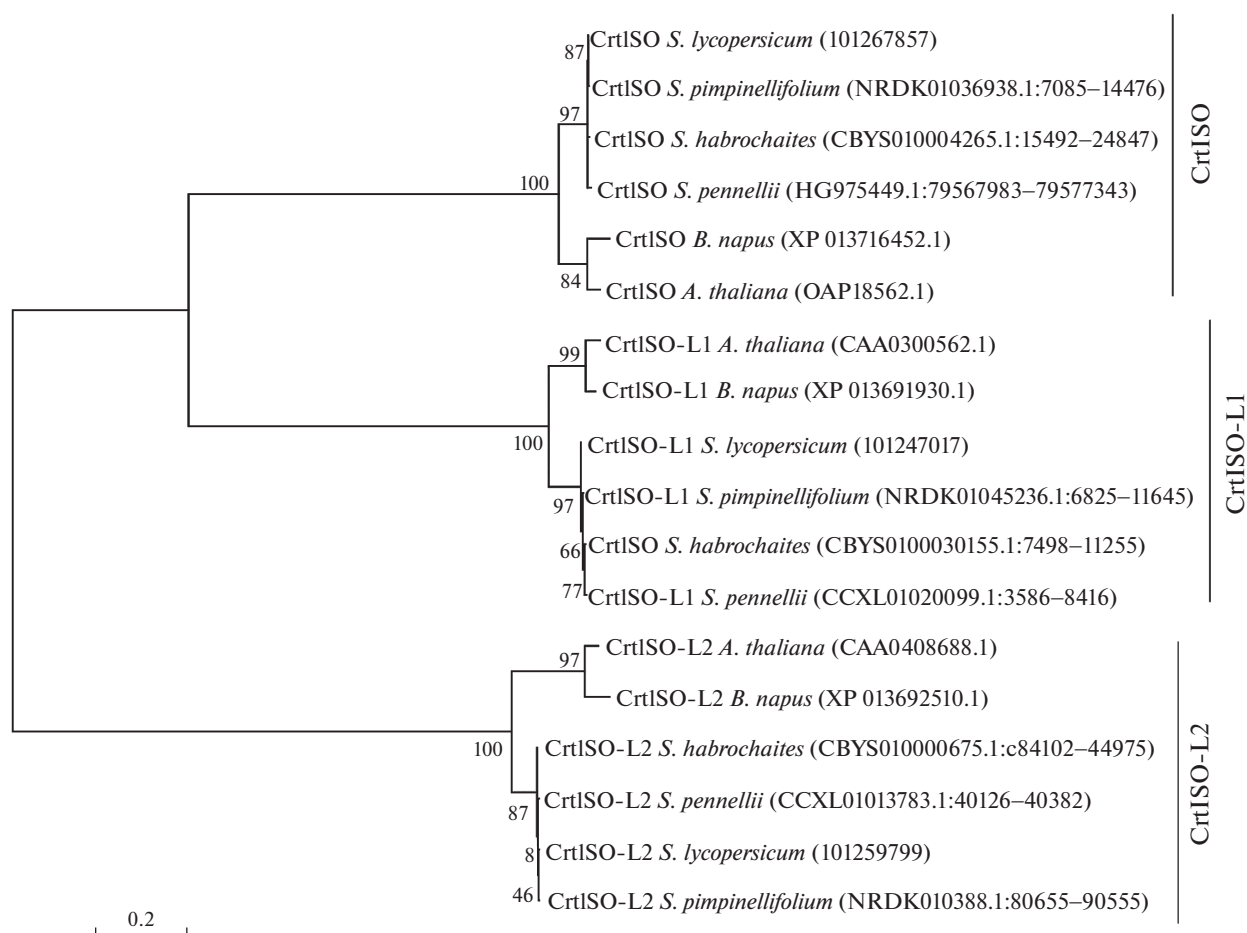
У растений синтез каротиноидов происходит во всех тканях. Высокий восстановительный потенциал данных соединений, связанный с линейной системой сопряженных двойных связей C=C, делает их сильными антиоксидантами и участниками стрессового ответа. В фотосинтезирующей ткани они вносят значимый вклад в защиту фотосинтетического аппарата. В запасующих тканях каротиноиды определяют пигментацию, что важно с точки зрения опыления (цветки) и распространения семян (плоды) [1–4].

Биосинтез каротиноидов начинается с образования 15-цис-фитоина, который в несколько этапов преобразуется в полностью-транс-ликопин, являющийся субстратом для двух метаболических потоков  $\beta$ - $\beta$  и  $\beta$ - $\epsilon$  с образованием полностью-транс- $\alpha$ - $\beta$ -каротинов и ксантофиллов. Цепочка реакций сопровождается цис-транс-изомерией системы сопряженных двойных связей. Так, цис-ликопин преобразуется в транс-ликопин под воздействием каротиноид-цис-транс-изомеразы CrtISO [5, 6].

Ген *CrtISO* (Solyc10g081650) идентифицирован в геноме томата *Solanum lycopersicum* L. при анализе мутации *tangerine*, при которой красная окраска спелого плода становится оранжевой [7]. Позднее в геноме томата найдены еще два гомолога *CrtISO*, аннотированные как *CrtISO-like 1* (*CrtISO-L1*; Solyc05g010180.2) и *CrtISO-L2* (Solyc07g021640) [2, 3].

*S. lycopersicum* входит в секцию Lycopersicon, состоящую из 12 видов томата, окраска спелого плода которых ассоциирована с эволюционным возрастом – от зеленой (древние виды) до желто-оранжево-красной (молодые виды). Поэтому виды томата являются удачной моделью для изучения каротиногенеза [8].

<sup>1</sup> Федеральное государственное учреждение  
“Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук”, Москва, Россия  
\*e-mail: gleb\_efremov@mail.ru



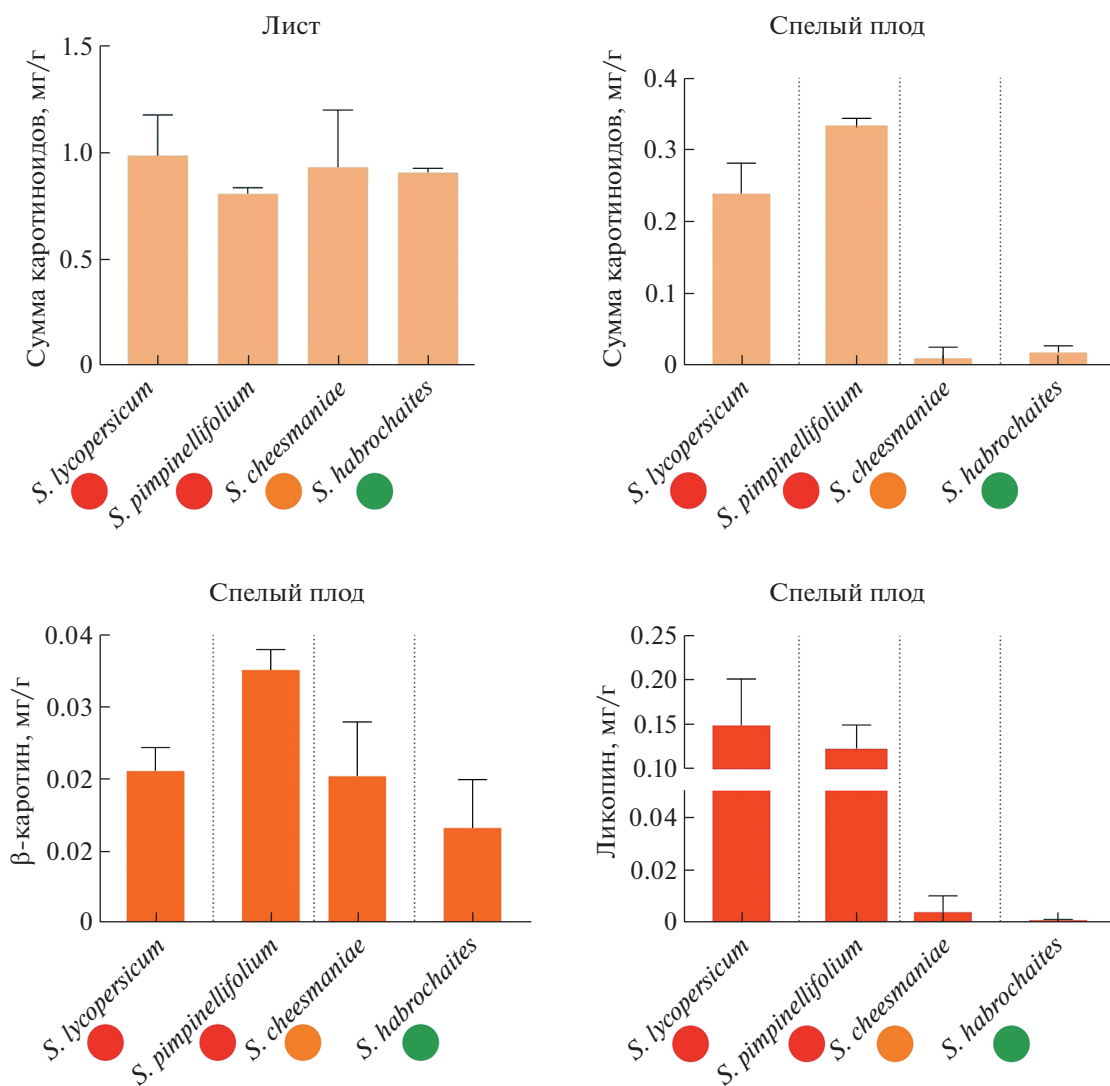
**Рис. 1.** Дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей CrtISO, CrtISO-L1 и CrtISO-L2 *S. lycopersicum* (cv. Heinz), *S. pimpinellifolium* (LA0480), *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA2144), *A. thaliana* и *Brassica napus*. Рядом с названиями белков – NCBI ID. Построено в MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>; метод Maximum Likelihood; 1000 бутстреп-реплика).

Целью данного исследования стала характеристика генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* у дикорастущих видов томата *S. habrochaites* (LA2144, зеленоплодный), *S. cheesmaniae* (LA0421, желтоплодный) и *S. pimpinellifolium* (LA0480, красноплодный) в сравнении с культивируемым видом *S. lycopersicum* (сорт Heinz, красноплодный).

Последовательности генов были найдены по гомологии с *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* *S. lycopersicum* в геномах видов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), за исключением *S. cheesmaniae*, и сравнены. Было обнаружено, что белки CrtISO содержат домен TIGR02730 (98–592 ак), характерный для каротин-изомераз, тогда как CrtISO-L1 и CrtISO-L2 – домен COG1233, специфичный для суперсемейства фитоин-дегидрогеназ. Однако все три типа последовательностей аннотированы как каротиноид-изомеразы – гомологи бактериальной фитоин-десатуразы CRTI, совмещающей функции десатурации и изомеризации [5, 9].

Предположительно сходная функция CrtISO, CrtISO-L1 и CrtISO-L2 в сочетании с низким сходством между ними (23–32%) может указывать их происхождение в результате давних дупликаций гена-предшественника. Филогенетический анализ, распредивший ортологи по трем кладам, показал, что клада CrtISO-L2 занимает базовое положение по отношению к сестринским кладам CrtISO и CrtISO-L1 (рис. 1). Это может свидетельствовать о более древнем происхождении CrtISO-L2, а также о сходстве функций CrtISO и CrtISO-L1. Наличие всех трех гомологов у *Arabidopsis thaliana* L. (рис. 1) позволяет предположить, что их возникновение предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

Для уточнения функции *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* было определено содержание каротиноидов и профиль экспрессии генов в листьях и спелых плодах *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*.



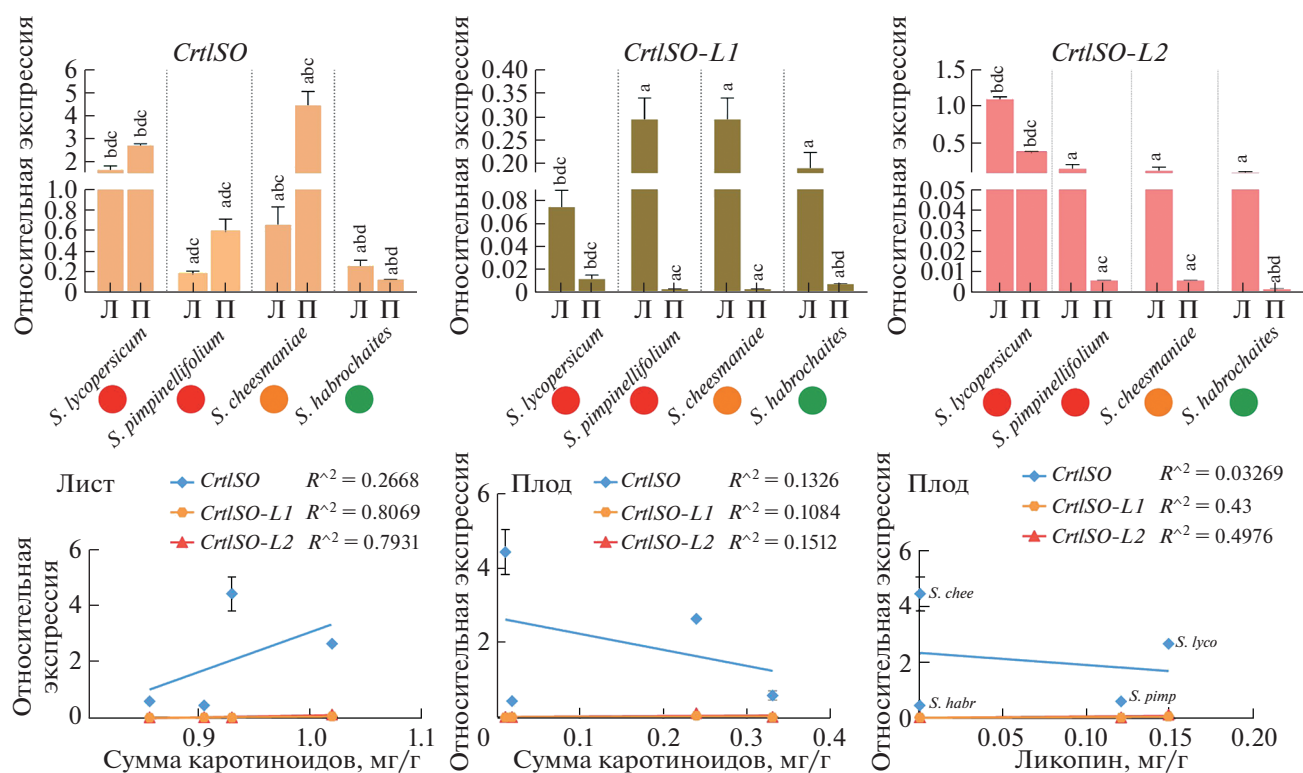
**Рис. 2.** Содержание (мг/г сырого веса) каротиноидов в листе (сумма каротиноидов) и спелом плоде (сумма каротиноидов, ликопин, β-каротин) *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* (окраска спелого плода обозначена цветным кругом рядом с названием). Измерения проводили согласно [6].

Биохимический анализ показал отсутствие между образцами различий по сумме каротиноидов в листьях; в плодах их содержание было выше в 20–30 раз у красноплодных видов в сравнении с *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites*. β-каротин в сходных количествах накапливали все плоды, а транс-ликопин — только красные (рис. 2).

Известно, что плод *S. lycopersicum* меняет окраску по мере созревания за счет того, что хлоропласты преобразуются в хромопласты, способные накапливать каротиноиды [10, 11]. Различная окраска плодов *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* при равном количестве β-каротина (рис. 2) может быть следствием нарушений в процессе формирования хромопластов у *S. habrochaites*, что было показано ранее [12]. С учетом сказанного, сходная сумма каротиноидов в листьях образцов

предполагает, что эволюция каротиногенеза у видов томата затронула только запасующие ткани, причем, в регуляции, скорее, идентичности пластид, чем пути биосинтеза каротиноидов.

Экспрессионный анализ обнаружил транскрипты трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов. В плодах уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был крайне низок (кроме высокого уровня *CrtISO-L2* у *S. lycopersicum*) в сравнении с *CrtISO*, который наиболее высоко экспрессировался у *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, соответственно) (рис. 3). Более высокий уровень транскриптов *CrtISO* по сравнению с *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* (рис. 3) согласуется с профилем экспрессии ортологичных генов у *Citrus sinensis* [13], что подтверждает роль



**Рис. 3.** Профиль экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* и его корреляция с содержанием каротиноидов в листе и спелом плоде *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* (окраска спелого плода обозначена цветным кругом рядом с названием). Количественную РВ-ПЦР проводили согласно [6]. Праймеры, специфичные для *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* и референсных генов *Expressed* и *ACTIN2*, использованы согласно [5, 6]. Результаты РВ-ПЦР и линейную регрессию оценивали в статистической программе Graph Pad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США) на основе двух биологических и трех технических повторов ( $p$ -value < 0.05 для значимых различий в экспрессии гена между одним типом ткани разных образцов;  $R^2 > 0.7$  для существенной корреляции).

*CrtISO* в каротиногенезе как в листьях, так и в плодах. Значительно большее количество транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листьях по сравнению с плодами (рис. 3) предполагает преимущественное участие этих генов в биосинтезе каротиноидов в фотосинтезирующей ткани.

Оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* не выявила такой взаимосвязи в спелом плоде (рис. 3), что было ранее продемонстрировано для *CrtISO* на выборке красноплодных сортов томата [6]. Однако в листьях были обнаружены положительные корреляции “сумма каротиноидов — уровень транскриптов *CrtISO-L1/CrtISO-L2*” (рис. 3).

Ранее на основании экспериментов по замалчиванию генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* томата было предположено участие *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в биосинтезе полностью-*транс*- $\zeta$ -каротина — пути, конкурентного по отношению к синтезу полностью-*транс*-ликопина, с образованием неизвестных изопреноидов [5, 14]. Прямая зависимость суммы каротиноидов в листьях от уровня экспрессии *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* (рис. 3)

может свидетельствовать в пользу данного предположения.

Таким образом, у анализируемых видов томата содержание каротиноидов в спелом плоде соответствует его окраске, и равное содержание каротиноидов в листьях предполагает сходную скорость фотосинтеза. Ген *CrtISO* играет определяющую роль в биосинтезе каротиноидов как в плодах, так и в листьях. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* могут определять сдвиг биосинтеза каротиноидов в сторону полностью-*транс*- $\zeta$ -каротина и терпеноидов, являющихся промежуточными продуктами в биосинтезе различных жировых соединений, и, таким образом, сохраняют раннюю функцию каротиноид-изомераз в синтезе каротиноидов для клеточных мембран.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-16-00016, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandmann G. // *New Phytol.* 2021. V. 232. P. 479–493.
2. Wei J., Xu M., Zhang D., et al. // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2010. V. 42. P. 457.
3. Dudit J.R., Kosentka P.Z., Miller M.A., et al. // *Hortic. Res.* 2022. V. 9. Article uhac084.
4. Valenta K., Kalbitzer U., Razafimandimby D., et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 14302.
5. Fantini E., Falcone G., Frusciantè S., et al. // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. P. 986.
6. Efremov G.I., Dzhos E.A., Ashikhmin A.A., et al. // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2022. V. 69. P. 352–362.
7. Isaacson T., Ronen G., Zamir D., et al. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 333.
8. Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S. // *Systematic Botany Monographs*. 2008. V. 84. P. 1–186.
9. Sato S., Tabata S., Hirakawa H., et al. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 635–641.
10. Osorio C.E. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Article 1235.
11. D'Andrea L., Rodriguez-Concepcion M. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Article 1071.
12. Kilambi H.V., Manda K., Rai A., et al. // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 4803–4819.
13. Pinheiro T.T., Peres L.E.P., Purgatto E., et al. // *Plant Cell Rep.* 2019. V. 38. P. 623.
14. Park H., Kreunen S.S., Cuttriss A.J., et al. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 321–332.

**FUNCTIONAL DIVERSIFICATION  
OF THE CAROTENOID-*CIS-TRANS*-ISOMERASES *CrtISO*, *CrtISO-L1*,  
AND *CrtISO-L2* IN TOMATO SPECIES  
(*SOLANUM*, SECTION LYCOPERSICON)**

**G. I. Efremov<sup>a,#</sup>, A. V. Shchennikova<sup>a</sup>, and E. Z. Kochieva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”,  
Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: gleb\_efremov@mail.ru

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

The expression of the genes of carotenoid-*cis-trans* isomerases *CrtISO*, *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* was studied in comparison with the content of carotenoids in tomato species with different ripe fruit colors: green (*Solanum habrochaites*), yellow (*S. cheesmaniae*) and red (*S. pimpinellifolium* and *S. lycopersicum*). More ancient origin of *CrtISO-L2* was shown in relation to *CrtISO* and *CrtISO-L1*. A similar content of total carotenoids (leaves) and  $\beta$ -carotene (ripe fruits) was found between the samples. Unlike fruits of *S. habrochaites* and *S. cheesmaniae*, red fruits accumulated lycopene and 20–30 times more total carotenoids. The highest level of transcripts both in leaves and in ripe fruits was detected for *CrtISO*. The *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* were transcribed high in leaves and low in fruits, except for the high expression of *CrtISO-L2* in *S. lycopersicum* fruits. No relationship was observed between the content of carotenoids and the level of gene expression in the fruit. In the leaves, a positive correlation between the amount of carotenoids and the levels of *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* transcripts was found.

**Keywords:** tomato species, *Solanum*, carotenogenesis, carotenoid-*cis-trans*-isomerase, evolution of tomato fruit color