

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ПАРАЛОГОВ ФИТОИНСИНТАЗЫ (PSY) У ВИДОВ ПЕРЦА КЛАДЫ *Annuum*

© 2021 г. М. А. Филюшин¹, *, Е. А. Дьяченко¹, Г. И. Ефремов¹, Е. З. Кочиева¹, А. В. Щенникова¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2020 г.

После доработки 04.06.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

В настоящем исследовании у пяти образцов трех видов перца (*Capsicum annuum*, *C. chinense* и *C. frutescens*), различающихся паттерном пигментации плода, идентифицированы гомологи генов *PSY1* и *PSY2*, кодирующих ключевой фермент каротиногенеза – фитоинсинтазу. Внутри исследуемой группы перцев определена вариабельность геномных последовательностей *PSY1* и *PSY2* и кДНК. Последовательности белков *PSY1* и *PSY2* были сходны (82%) и различались N- и C-концевыми инделями NAGLRYSYD и KLTSSSL, а также консервативными мотивами, характерными для групп гомологов *PSY2* и *PSY1*. Экспрессия генов *PSY1* и *PSY2* проанализирована в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожуре и мякоти плодов в процессе созревания у анализируемых образцов перца. Показан максимальный уровень экспрессии *PSY1* в лепестках, а также в перикарпе зрелых плодов образцов *C. annuum* и *C. frutescens*. У образца *C. chinense* Pimenta da Neude ген *PSY1* экспрессировался только в листьях. Транскрипты *PSY2* обнаружены во всех анализируемых органах образцов перца, максимальный уровень – в листьях, минимальный – в перикарпе плодов. Полученные данные предполагают сохранение у видов перца гомологами *PSY1* и *PSY2* консервативных ключевых функций в синтезе каротиноидов в плодах (*PSY1*) и фотосинтезирующих тканях (*PSY2*).

Ключевые слова: фитоинсинтаза, *PSY1*, *PSY2*, *Capsicum*, виды перца, окраска плода.

DOI: 10.31857/S0016675821020041

Растения, за редким исключением, являются фотосинтезирующими организмами и для поглощения и преобразования световой энергии используют пигменты – хлорофиллы и каротиноиды, при этом каротиноиды задействованы также для защиты молекул хлорофилла от фотоокисления [1]. Более того, каротиноиды являются предшественниками фитогормонов (абсцизовой кислоты и стриголактонов), а их производные могут действовать как сигнальные молекулы в процессах развития растений и в ответ на воздействия окружающей среды [2–4]. Также растения используют каротиноиды как оптические сигналы при взаимодействии с насекомыми и другими животными, пигментируя цветковые органы и/или плоды [4].

Механизм биосинтеза каротиноидов консервативен, однако по мере эволюции растений к общей специализации данных пигментов добавлялись новые функции. Так, увеличение фотосинтезирующей поверхности при образовании плоского листа из радиально-симметричного стебля повысило необходимость фотозащиты [1]. Появление репродуктивных органов добавило необходимость окраски лепестков и тычинок для привлечения

опылителей [5]. Преобразование сухого плода в сочный и окрашенный сделало его привлекательным для животных, что дало растениям большие возможности в распространении семян [6]. Такая многофункциональность продуктов каротиногенеза является следствием эволюционной дубликации последующей диверсификации генов биосинтеза каротиноидов. Прежде всего это касается гена-предшественника фитоинсинтазы *PSY* (phytoene synthase), чьи продукты играют ключевую роль в инициации синтеза каротиноидов в различных органах растения [7, 8].

Фитоинсинтаза *PSY* локализуется в строме пласта и катализирует образование 15-цис-изомера фитоина, предшественника всех каротиноидов [7, 9]. Несколько последующих стадий приводят к синтезу ликопина, который в дальнейшем используется для синтеза α -каротина и β -каротина (оранжевый пигмент). В свою очередь, α -каротин и β -каротин могут превращаться в желтые пигменты лютеин и ксантофиллы [9, 10].

У растений описано от одного до трех паралогов *PSY*. Геном злаковых (Poaceae) и некоторых других видов однодольных содержит три гена *PSY*

[11]. Двудольные виды в этом плане более разнообразны. К примеру, в геноме *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. присутствует только один ген *PSY* [12]. Для других двудольных описано, как минимум, два гена фитоинсиназы. В то же время геном люцерны и томата содержит три гена *PSY* [3, 13].

Первый идентифицированный ген фитоинсиназы растений, *PSY1*, специфичен в основном для хромопластов и задействован в пигментации сочного плода при его созревании [14]. При отсутствии транскрипции *PSY1* не происходит синтеза каротиноидов в плодах, а суперэкспрессия *PSY1* значительно увеличивает каротиногенез в запасующих органах (клубнях картофеля, плодах томата и т.д.) [15, 16]. Второй ген *PSY2* специфичен, прежде всего, для хромопластов и его экспрессия максимальна в фотосинтезирующей ткани [17]. Третий паралог, *PSY3*, идентифицирован не у всех видов. У томата, люцерны и зерновых *PSY3* активен в корнях в ответ на стресс, индуцирует синтез апокаротиноидов (окисленных производных каротиноидов), участвующих в формировании симбиотических и паразитарных отношений, а также в адаптации к дефициту некоторых пищевых элементов [3, 18].

Белки *PSY1* и *PSY2* высоко гомологичны, однако различаются по биохимическим свойствам [7, 19]. Тем не менее нельзя говорить об их строгой тканеспецифичности: оба гена транскрибируются в одинаковых тканях, но значительно различаются (до 100 раз) уровнями транскрипции [3]. Это обусловлено тем, что эффективность *PSY1* в каротиногенезе ниже, чем *PSY2*, поэтому для синтеза большого количества каротиноидов в плодах необходим более высокий уровень транскрипции *PSY1* [20].

Наиболее удобной и изученной моделью для исследования созревания сочных плодов, включая синтез вторичных метаболитов и вероятную эволюцию соответствующих генетических механизмов, считаются виды и сорта томата (секция *Lycopersicon* рода *Solanum*) [21]. Виды томата формируют цветки с желтыми лепестками, но различаются окраской зрелых плодов [22]. У томата овощного *S. lycopersicum* L. оба гена, *PSY1* и *PSY2*, задействованы в определении окраски лепестков [7]. Это свидетельствует об изначально общей роли *PSY1* и *PSY2* в окраске лепестков и о более раннем происхождении *PSY2* по отношению к *PSY1*, с приобретением *PSY1* позднее новой функции – пигментация плодов [23]. Теоретически полученные знания могут быть применены к другим формирующим сочные плоды культурам.

Род *Capsicum* (Solanaceae) включает более 35 видов, объединенных по морфофизиологическим признакам в несколько филогенетических клад. Виды *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. (клада *Annuum*) и *C. baccatum* L. (клада *Baccatum*)

были доместичированы [24, 25]. Перец формирует сочный плод, окраска которого различается у видов и сортов [26]. Как и у томата, перикарп плодов перца по мере созревания проходит стадию замещения хромопластов хромопластами, в которых и накапливаются синтезируемые каротиноиды [27]. На сегодняшний день у *C. annuum* L. обнаружено два паралога гена фитоинсиназы – *PSY1* и *PSY2* [28]. В отличие от томата, формирующего цветки с желтыми лепестками, цветки видов *Capsicum* имеют белую или антоциановую пигментацию, а каротиноидный путь в плодах *Capsicum* идет дальше синтеза ликопина и каротинов (обычных для плодов томата) и доходит до ксантофиллов β -каротинового пути, из которых под действием специфичного для видов *Capsicum* фермента капсантинкапсорубинсиназы (CCS) образуются красные пигменты капсантин и капсорубин [26]. Состав каротиноидов в плодах перца значительно отличается от такового у томата и представлен в основном капсантином и капсорубином, а также β -каротином, β -криптоксантином, лютеином, зеаксантином, антраксантином и виолаксантином, различное сочетание и соотношение которых определяет многообразие оттенков окраски плодов [29]. Суммарное содержание каротиноидов в плодах перца значительно превышает их количество в плодах томата [26, 30]. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что прямой перенос данных по каротиногенезу у видов томата на другие виды с сочными плодами, в частности перец, не совсем корректен и необходимы дополнительные уточняющие исследования.

Целью настоящей работы стала оценка вариабельности паралога фитоинсиназы у видов *Capsicum* клады *Annuum*. Для этого гены, гомологичные *PSY1* и *PSY2*, были идентифицированы у видов перца *Capsicum annuum* L. (сорта Сибирак, Сириновый куб и Отелло), *C. frutescens* L. (сорт Самоцвет) и *C. chinense* Jacq. (сорт Pimenta da Neyde). Была охарактеризована структура и филогения идентифицированных генов и определен профиль их экспрессии в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожице и мякоти плодов процессе созревания, а также возможные корреляции уровня экспрессии *PSY1* и *PSY2* с содержанием каротиноидов в плоде в процессе созревания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе были использованы образцы трех родственных видов перца, формирующих кладу *Annuum*: *C. annuum* (сорта Сибирак, Сириновый куб и Отелло), *C. frutescens* (сорт Самоцвет) и *C. chinense* (сорт Pimenta da Neyde) (рис. 1). Растения были выращены в пленочной теплице в Федеральном научном центре овощеводства (Московская область). Набор тканевых препаратов для каждого анализируемого образца

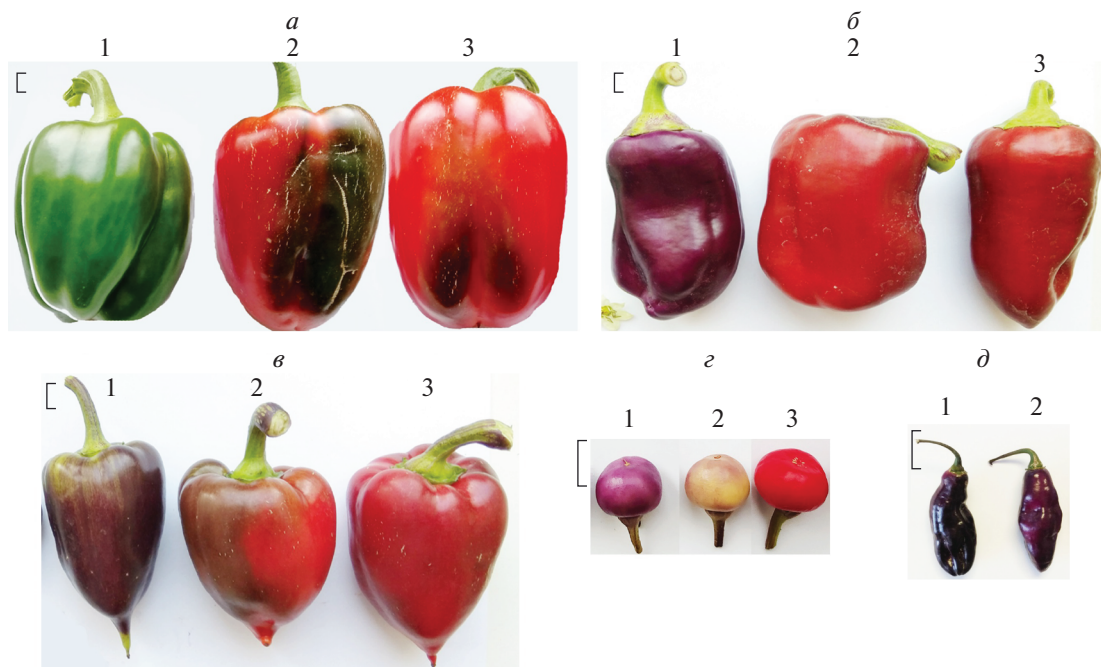


Рис. 1. Плоды анализируемых сортов перца: а – Сибиряк (*C. annuum*), б – Сиреневый куб (*C. annuum*), в – Отелло (*C. annuum*), г – Самоцвет (*C. frutescens*), д – Pimenta da Neyde (*C. chinense*). Цифрами обозначены стадии созревания плодов: 1 – незрелый плод финального размера (MF, mature fruit); 2 – бланжевый плод (IR, intermediate ripe; соответствует переходу к зрелости с постепенной сменой окраски); 3 – плод биологической спелости (RF, ripe fruit). Масштабная линия равна 1 см.

включал молодые листья, чашелистики, лепестки, завязь, а также кожуру и мякоть плода на трех стадиях созревания: незрелый плод финального размера (MF, mature fruit); бланжевый плод (IR, intermediate ripe; соответствует переходу к зрелости с постепенной сменой окраски); плод биологической спелости (RF, ripe fruit). Выбранные для работы сорта представляют два основных паттерна изменения окраски плода в процессе созревания у видов перца комплекса *Annuum*. Для сорта Сибиряк (*C. annuum*) последовательность изменения окраски следующая: зеленая (стадия MF), мозаичная зелено-красная (стадия IR), глубокая красная (стадия RF). Для сортов Отелло и Сиреневый куб (*C. annuum*) – это фиолетовая (стадия MF), красная/фиолетово-красная (стадия IR), глубокая красная (стадия RF). Для вида *C. frutescens* (Самоцвет): фиолетовая (стадия MF), бледно-желтая (стадия IR) и красная (стадия RF). Образец *C. chinense* (Pimenta da Neyde) формировал плоды фиолетовые на всех стадиях развития, при этом стадия биологической спелости (RF) у данного сорта не выражена, поэтому были взяты только плоды стадий MF и IR (рис. 1). Индивидуальные ткани растений каждого образца собирали одновременно, измельчали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Таким образом, для характеристики межвидовой варибельности генов фитоинсинтазы были

взяты образцы перца с типичными для перцев паттернами пигментации плода и один сорт (Pimenta da Neyde) с аномальной каротиноидной пигментацией.

Биохимический анализ тканей анализируемых образцов перца. Содержание суммы каротиноидов в плодах исследуемых образцов перца определяли методом спектрофотометрии в хлороформ-метанольных экстрактах, согласно [31, 32], в двух биологических и трех технических повторах.

Идентификация гомологов генов PSY1 и PSY2. Из ткани листа каждого из пяти анализируемых образцов перца выделяли геномную ДНК методом СТАВ [33] и использовали (100 нг) в качестве матрицы для амплификации ДНК-последовательностей, гомологичных *PSY1* и *PSY2*. Праймеры для амплификации и секвенирования фрагментов полноразмерных генов разрабатывали на основе доступных в базе данных NCBI полногеномных последовательностей *C. annuum PSY1* (LOC107868281 bifunctional 15-cis-phytoene synthase, chromoplatic, Gene ID: 107868281) и *PSY2* (LOC107859651 phytoene synthase 2, chloroplatic, Gene ID: 107859651) (табл. 1). Использовали праймеры CaPSYF/R и следующие условия ПЦР: исходная денатурация (94°C 10 мин); 36 циклов денатурации (94°C 40 с), отжига (56°C 40 с) и синтеза (65°C 4 мин); финальное достраивание фрагментов (65°C 7 мин). Гены амплифицировали с исполь-

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Праймер	Последовательность (5' → 3')	Назначение
<i>PSY1</i>	CaPSY1F	TCAGAATGTCTGTTGCCTTG	Аmplификация, секвенирование
	CaPSY1ex3F	ATGGTGCAGGAGAACAGAC	
	CaPSY1ex3R	AACTGTGTCGGACAAAGCAG	
	CaPSY1ex5R	CATCTACTAGCTGCGCTCAA	
	CaPSY1ex5F	TTAGCACAGGCAGGTCTATC	
	CaPSY1R	TCCTGATTTTCATGTTCTTGTAGA	
	CaPSY1ex1R	ACATCATATACCATCYGTTTC	
<i>PSY2</i>	CaPSY2F	AGCATGTCTGTTGCTTTGTTG	
	CaPSY2ex3F	CTGATGAGCTTGTGATGGC	
	CaPSY2ex3R	AATCTGGAAACGGTATCGG	
	CaPSY2ex4F	CTCTATTGTTACTATGTCGCTG	
	CaPSY2ex5R	AATCCTCCACTTATCAGTCAC	
	CaPSY2R	CTTCATTCATGTCTTTGYTAGTG	
	CaPSY2ex1R	CAACACCACATCATAACC	
<i>PSY1</i>	<i>PSY1-F</i>	GTGAAGAGACAGCTGAGATCG	РВ-ПЦР
	<i>PSY1-R</i>	TCTCCGGAGTCATTAGCATCG	
<i>PSY2</i>	<i>PSY2-F</i>	AAGGAGTCGCAGAACTGAGC	
	<i>PSY2-R</i>	GTCGTTTCGCTTCAATCTCATCTAA	
<i>Actin7</i>	<i>Actin7-F</i>	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC	
	<i>Actin7-R</i>	TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG	

зованием полимеразы LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, США) и термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, США). ПЦР-продукты ожидаемой длины очищали с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, США) и секвенировали (2–4 клон для каждого образца) на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, США).

Структурный анализ гомологов генов *PSY1* и *PSY2* и кодируемых ими белков. Анализ и выравнивание полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>) в сравнении с известными последовательностями *C. annuum PSY1* (Gene ID: 107868281) и *PSY2* (Gene ID: 107859651), а также с *S. lycopersicum PSY1* (Gene ID: 543988) и *PSY2* (Gene ID: 543964). Кроме того, был проведен биоинформационный поиск гомологичных генов в секвенированных геномах видов перца *C. baccatum* и *C. chinense*, обнаруженные последовательности были использованы в сравнительном структурном анализе. Положение нуклеотидных и аминокислотных замен определяли внутри группы *Cap-sicum* и относительно *S. lycopersicum PSY1* и *PSY2*. Консервативные домены и мотивы в кодируемых

белках определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков предсказывали с помощью программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>). Структуру белков анализировали с использованием программы Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). Молекулярную массу и значение изоэлектрической точки (pI) определяли с помощью программы Isoelectric Point Calculator (<http://isoelectric.org/>).

Филогения генов *PSY1* и *PSY2*. Для филогенетического анализа эволюционных отношений, как идентифицированных генов, так и видов перца, использовали известные последовательности генов, кДНК и белков PSY томата *S. lycopersicum* (*PSY1*, Gene ID: 543988; CDS ID: EU021055.1 (cv. Red Setter) и EF157835.1; *PSY2*, Gene ID: 107859651; CDS ID: EU021055.1 (cv. Red Setter)) и видов перца *C. annuum* cv. Zunla-1 (*PSY1*, NC_029980.1:c205334820–205328571; *PSY2*, NC_029978.1:142877052–142881261), *C. annuum* cv. Valencia (*PSY1*, GU085273.1), *C. baccatum* isolate PBC81 (*PSY1*, CM008446.1:19444825–19449400; *PSY2*, CM008444.1:141318038–141337266) и *C. chinense* isolate PI159236 (*PSY1*, CM008434.1:12099868–12105776; *PSY2*, CM008432.1:150147614–150156089).

Таблица 2. Характеристики гомологов генов *PSY1* и *PSY2* у видов и сортов *Capsicum* в сравнении с *S. lycopersicum*

Образец перца	Ген	NCBI ID	Длина экзона/интрона, пн						Ген, пн	кДНК, пн	Белок, а.о.	MW/pI
			I	II	III	IV	V	VI				
<i>C. annuum</i> сорт Сибиряк	<i>PSY1</i>	MT313932	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.140/8.25
	<i>PSY2</i>	MT313937	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.535/8.53
<i>C. annuum</i> сорт Сиреневый куб	<i>PSY1</i>	MT313933	448/96	51/261	173/328	236/291	193/649	159	2885	1260	419	47.066/8.14
	<i>PSY2</i>	MT313938	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.430/8.60
<i>C. annuum</i> сорт Отелло	<i>PSY1</i>	MT313934	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.094/8.25
	<i>PSY2</i>	MT313939	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.405/8.43
<i>C. frutescens</i> сорт Самоцвет	<i>PSY1</i>	MT313935	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.126/8.25
	<i>PSY2</i>	MT313940	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.434/8.60
<i>C. chinense</i> сорт Pimenta da Neyde	<i>PSY1</i>	MT313936	448/96	51/261	173/328	236/291	193/649	159	2885	1260	419	47.052/8.14
	<i>PSY2</i>	MT313941	466/101	51/753	173/193	236/219	193/433	180	2998	1299	432	48.362/8.43
<i>S. lycopersicum</i> сорт Red Setter*	<i>PSY1</i>	EF534740.1	412/120	51/423	173/313	236/518	193/689	174	3302	1239	413	46.615/8.10
	<i>PSY2</i>	EU021055.1	484/107	51/710	173/267	242/227	193/398	180	3032	1317	438	49.326/8.05

Примечание. MW – молекулярная масса белков, кДа; pI – изоэлектрическая точка. * Последовательности из базы NCBI.

Анализ проводили с помощью метода ближайших соседей (NJ; модель подбирали в программе Modeltest) пакета программ MEGA 7.0.

Профиль ко-экспрессии гомологов генов *PSY1* и *PSY2*. Препараты суммарной РНК выделяли из отобранного растительного материала, очищали от примесей ДНК и использовали для синтеза первой цепи кДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия; GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, США).

Профиль экспрессии *PSY1* и *PSY2* определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием набора “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклера CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Праймеры для РВ-ПЦР были разработаны ранее, на основе доступных в базе данных NCBI последовательностей мРНК *C. annuum PSY1* (X68017) и *PSY2* (XM_016704726.1) [34] (табл. 1). Для нормализации уровня транскрипции генов использовали экспрессию референсного гена *Actin7* [35]. Реакции проводили в трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Graph Pad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и анализ структуры гомологов *PSY1* и *PSY2* у образцов трех видов перца

У образцов видов перца *C. annuum* (сорта Сибиряк, Сиреневый куб и Отелло), *C. frutescens* (сорт Самоцвет) и *C. chinense* (сорт Pimenta da Neyde) были определены геномные последователь-

ности генов *PSY1* и *PSY2*, гомологичные известным генам *PSY1* и *PSY2* *C. annuum* (NC_029980.1; NC_029978.1). Последовательности были идентифицированы, начиная с АТГ-кодона, без нетранслируемых областей 5'- и 3'-UTR, где у *PSY1* и *PSY2* *S. lycopersicum* находятся нетранслируемые экзоны. Основные характеристики полученных генов приведены в табл. 2.

Длина генов *PSY1*, содержащих шесть экзонов, составила 2844 пн (*C. annuum* св. Сибиряк и Отелло; *C. frutescens* св. Самоцвет) и 2885 пн (*C. chinense* св. Pimenta da Neyde; *C. annuum* св. Сиреневый куб) (табл. 2). Разница в размере генов была обусловлена присутствием вставки 41 пн в интроне IV. Интересно, что в отличие от Pimenta da Neyde в известной последовательности *PSY1* образца *C. chinense* (CM008434.1:12099868–12105776) такой вставки нет. Последовательность *PSY1* у *C. baccatum* (CM008446.1:19444825–19449400) имела длину 2846 пн, а у *S. lycopersicum* (EF157835.1) – 3302 пн (от АТГ до стоп-кодона).

Длина гомологов *PSY2* у исследуемых видов/сорт перца составила 2985 пн, за исключением *C. chinense* св. Pimenta da Neyde (2998 пн, за счет двух вставок – 9 и 4 пн в интронах II и V). У вида *C. baccatum* длина гена *PSY2* составляла 2994 пн (CM008444.1:141318038–141337266), а у *S. lycopersicum* – 3032 пн (EU021055.1). Аналогично *PSY1* ген *PSY2* содержит шесть экзонов, размеры которых идентичны у анализируемых образцов перца.

В сравнении с *PSY1* и *PSY2* *S. lycopersicum* в последовательностях *PSY1* и *PSY2* исследуемых образцов *Capsicum* было обнаружено 955 и 847 мононуклеотидных вариабельных сайтов SNPs (28.24 и 27.09% от выровненных длин), из которых только 128 (13.40%) и 97 (11.45%) были локализованы в кодирующей последовательности. Между собой геномные последовательности *PSY1/PSY2* образцов

перца различались числом SNPs: 75 (2.60%)/51 (1.70%), больше трети которых находились в кДНК (24 (32.00%)/19 (37.25%)). При этом большая часть SNPs была локализована в экзоне I: 16 (66.70% всех экзонных замен) у *PSY1* и 14 (73.70%) у *PSY2*.

Размер кДНК *PSY1* и *PSY2* у всех исследуемых образцов перца составил 1260 и 1299 пн соответственно (табл. 2). Различие в размере кДНК двух паралога *PSY* обусловлено большей длиной экзон I и VI гена *PSY2*.

Длина белков *PSY1* и *PSY2* была инвариантна у всех исследуемых образцов клады *Annuum* и составила 419 и 432 а.о. соответственно (табл. 2; рис. 1 и 2 в Приложении) и отличалась от последовательностей генов фитоинсинтазы *C. baccatum* (клада *Baccatum*) четырьмя (D194G, R91Q, C/Y59W, G/A40V – *PSY1*) и одним (V15F – *PSY2*) замещениями а.о. (рис. 2), которые, тем не менее, имели нейтральный характер (согласно PROVEAN). В последовательности *PSY1* сорта Отелло обнаружено всего одно замещение а.о., которое внутри группы анализируемых образцов может иметь радикальный характер (согласно PROVEAN) – M207V. В последовательности *PSY2* сортов Сиреневый куб и Pimenta da Neyde также было обнаружено по одному предположительно радикальному замещению а.о. – S136I и N186T соответственно.

В сравнении с *PSY1* томата все идентифицированные гомологи *PSY1 Capsicum* имели вставку R53InsQ64 (RWSFGSCLGGAQ) и делецию на С-конце A408_R412del (ASLQR). В последовательности *PSY2 Capsicum*, в сравнении с гомологичным белком *S. lycopersicum*, выявлена делеция L32_F37del (LESSRF) (рис. 2). Анализ инделей в программе PROVEAN показал, что они носят нейтральный характер и не должны существенно изменить конформацию и функцию белка.

Несколько радикальных замещений а.о. было обнаружено при сравнении *PSY1* и *PSY2* перца с соответствующими белками *S. lycopersicum* (*S. lycopersicum* vs. *Capsicum* spp.): Q79R, P106K, G125S, M195V и W357L – для *PSY1* и G71D/G, S142I, N192T и D335G – для *PSY2* (рис. 2).

В целом идентифицированные последовательности перца *PSY1* и *PSY2* были высоко гомологичны (идентичность 82%). Главным отличием *PSY2* от *PSY1* стало присутствие вставок на N- и С-конце белка: NAGLRYSD (в положении 58–65 а.о.) и KLTSSSL (в положении 423–429 а.о.).

Дополнительно с использованием MEME 5.1.1 был проведен анализ возможных консервативных мотивов, специфичных для белков *PSY1* и *PSY2* (рис. 3). Всего было выявлено 14 достоверных мотивов, 11 из которых были общими для всех последовательностей. Были выявлены мотивы 10 и 13, характерные для клады *PSY2*, и мотив 11, ха-

рактерный для клады *PSY1*. Отсутствие мотива 11 в последовательности *PSY1 S. lycopersicum* было обусловлено отсутствием специфичной для *Capsicum* вставки R53InsQ64, о которой упоминалось выше.

Согласно результатам анализа в программе NCBI-CDD все анализируемые белки перца *PSY1* (с 75 по 405 а.о.) и *PSY2* (с 92 по 430 а.о.) содержат консервативный домен фитоинсинтазы. Это подтверждает принадлежность идентифицированных гомологов *PSY1* и *PSY2* к ферментам биосинтеза изопреноидов (Isoprenoid Biosynthesis enzymes, Class 1), входящим в суперсемейство синтаз и терпеновых циклаз (trans-isoprenyl diphosphate synthases IPPS and class I terpene cyclases).

Проведенный анализ структуры гомологов *PSY1* и *PSY2* в программе Phyre2 позволил предсказать возможную трехмерную структуру данных белков. С достоверностью >90% моделированы 68% (*PSY1*) и 67% (*PSY2*) аминокислотных остатков с использованием четырех структурных матриц: c4hd1A_ (129–390/135–396 а.о., 62/60%-ное покрытие; squalene synthase HpnC, *Alicyclobacillus acidocaldarius*); c5iysA_ (126–412/132–419 а.о., 68/66%; phytoene synthase, *Enterococcus hirae* dehydro-squalene synthase); c3we9A_ (126–405/131–411 а.о., 66/64%; YisP, *Bacillus subtilis*); c2zcpA_ (3W7F; 126–411/132–418 а.о., 68/66%; c(30) carotenoid dehydro-squalene synthase CrtM, *Staphylococcus aureus*) [36]. Оставшиеся 143 а.о. (в основном на N-конце) были моделированы *ab initio*. Было выявлено, что фолдинг *PSY*-белков имеет преимущественно спиральный характер (60–63%), 2% последовательности приходится на β-складки, а структура 26% неупорядочена. Гомологи обоих фитоинсинтаз имели большую центральную полость, наблюдаемую и в других изопреноидных синтазах, использующих данную полость для пристраивания туда продукта [36]. Единичные случаи обнаруженных нами радикальных миссенс-мутаций (*PSY1*, Отелло; *PSY2*, Сиреневый куб и Pimenta da Neyde) никак не влияли на фолдинг и активные центры белков.

Филогенетический анализ

Для оценки филогении исследуемых сортов и видов перца был проведен кластерный анализ и построены дендрограммы на основе полногеномных, кодирующих и белковых последовательностей идентифицированных гомологов *PSY1* и *PSY2*. Для сравнения в анализе были использованы известные последовательности гомологов *PSY1* и *PSY2* томата *S. lycopersicum*, а также гомологичные последовательности видов перца *C. annuum*, *C. chinense* и *C. baccatum* из базы данных NCBI.

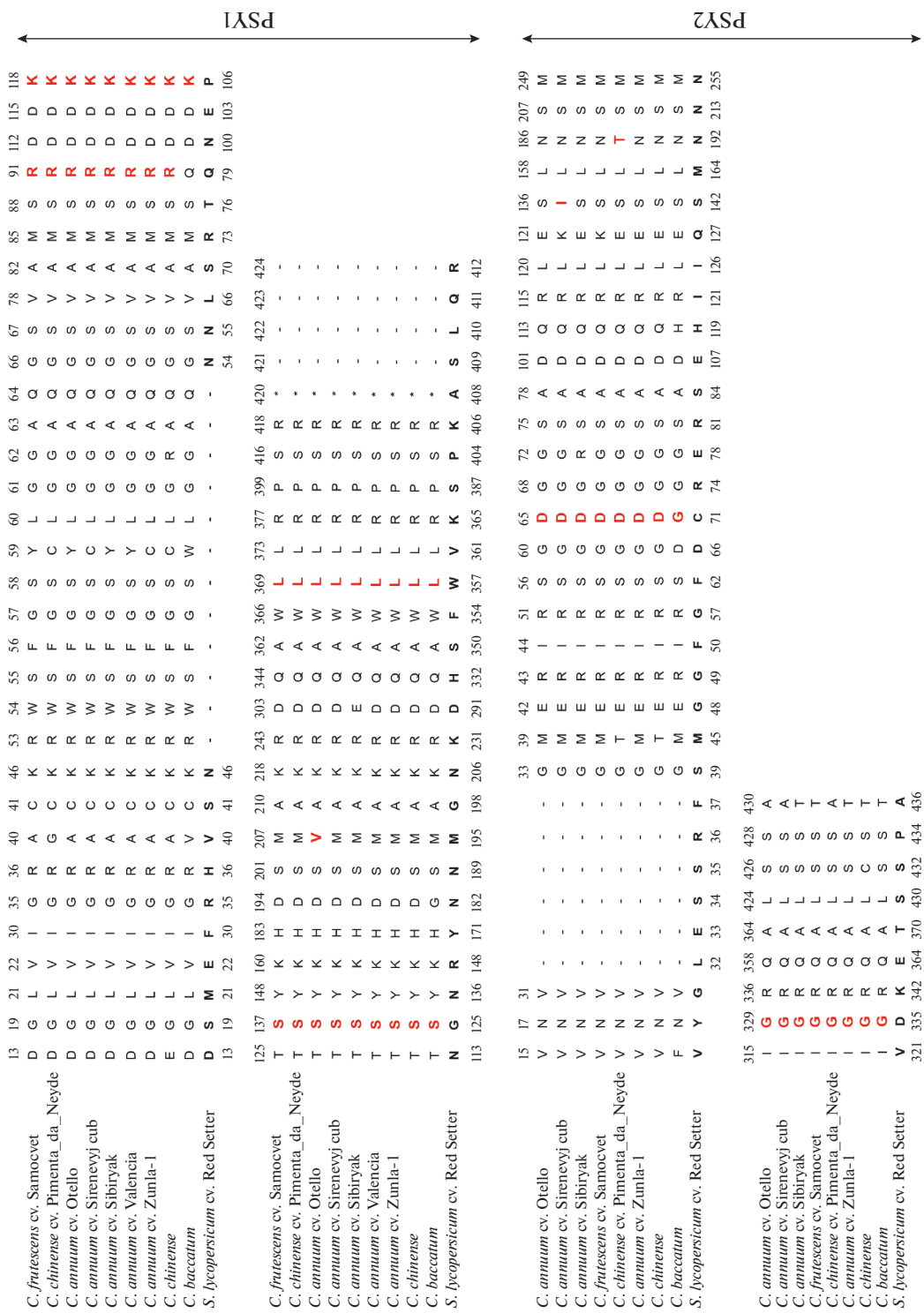


Рис. 2. Замещения аминокислотных остатков в последовательностях гомологов PSY1 и PSY2 у видов *Sarpsicum* в сравнении друг с другом и с референсными последовательностями PSY1 и PSY2 *S. lycopersicum*.

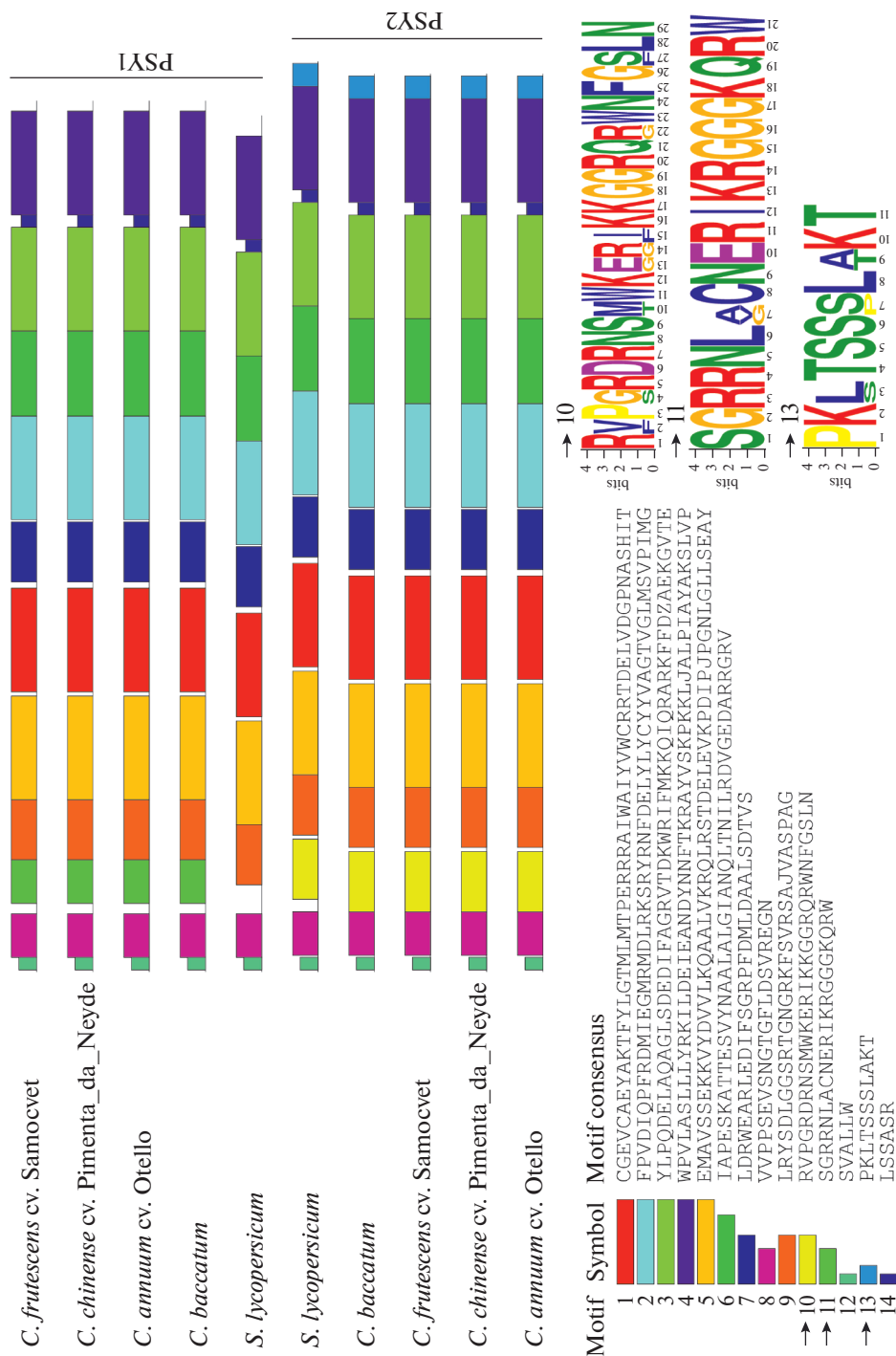


Рис. 3. Схема консервативных мотивов, характерных для клад PSY1 и PSY2 *Capsicum* и *S. lycopersicum* (MEME 5.1.1). Для анализа использованы последовательно-сти идентифицированных в данной работе фитогинтаз PSY1 и PSY2 сортов Самоцвет (*C. frutescens*), Отелло (*C. annuum*) и Pimenta da Neyde (*C. chinense*), а также видов *C. baccatum* (CM009446.1; CM08444.1) и *S. lycopersicum* (EF534740.1; EU021055.1).

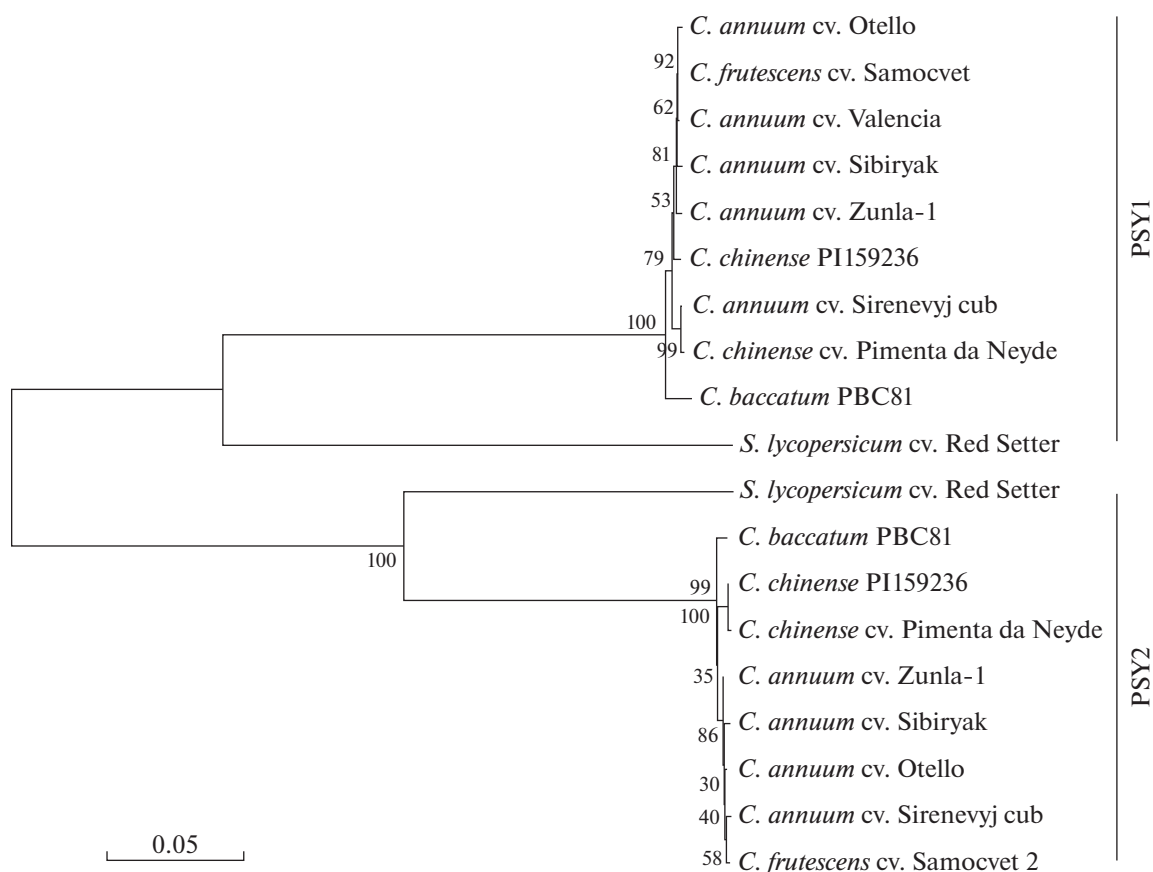


Рис. 4. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей гомологов *PSY1* и *PSY2* томата *S. lycopersicum* и видов перца *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. frutescens* и *C. chinense* (MEGA7.0, метод NJ, Tajima-Nei model, bootstrap 1000). Значения bootstrap для 1000 выборок показаны в основании ветви.

Все три полученные дендрограммы были конгруэнтны и группировали образцы в два больших кластера, объединяющих последовательности гомологов *PSY1* и *PSY2* (рис. 4). Внутри каждого кластера последовательности *S. lycopersicum* формировали сестринскую ветвь кладе *Capsicum*. Клады *PSY1* и *PSY2* *Capsicum* организовывались сходным образом: последовательности *C. annuum*, *C. chinense* и *C. frutescens* формировали группу, сестринскую ветвь к которой образовывал образец *C. baccatum* (рис. 4).

Профиль ко-экспрессии генов *PSY1* и *PSY2*

Экспрессия генов *PSY1* и *PSY2* была впервые проанализирована в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожице и мякоти плодов на трех стадиях (MF, IR, RF) созревания у образцов трех видов перца (рис. 5).

У сортов Сибиряк, Отелло, Сиреневый куб (*C. annuum*) и Самоцвет (*C. frutescens*) транскрипты *PSY1* были обнаружены во всех анализируемых органах, при этом уровни транскрипции зна-

чительно варьировали между разными органами одного образца и однотипными тканями разных образцов. Максимальные уровни экспрессии *PSY1* были выявлены в лепестках (на сходном уровне), а также в перикарпе зрелых плодов (стадия 3, RF). И кожица, и мякоть плода данных сортов содержали лишь следовые количества транскриптов *PSY1* на стадии 1 незрелого плода (MF) и характеризовались их резким ростом в зреющих плодах (стадии 2 и 3, IR и RF). Мякоть зрелого плода сорта Отелло имела самый высокий уровень транскрипции *PSY1* (в 10 раз выше, чем у остальных образцов), однако в кожице уровень экспрессии *PSY1* был сопоставим с таковой у других образцов перца (рис. 5).

В листьях анализируемых образцов перца экспрессия *PSY1* была на уровне либо следовых количеств (у сортов Отелло и Сиреневый куб), либо достигала 0.06–0.08 (у сортов Самоцвет, Сибиряк и Pimenta da Neyde). В отличие от остальных образцов перца у сорта Pimenta da Neyde (*C. chin-*

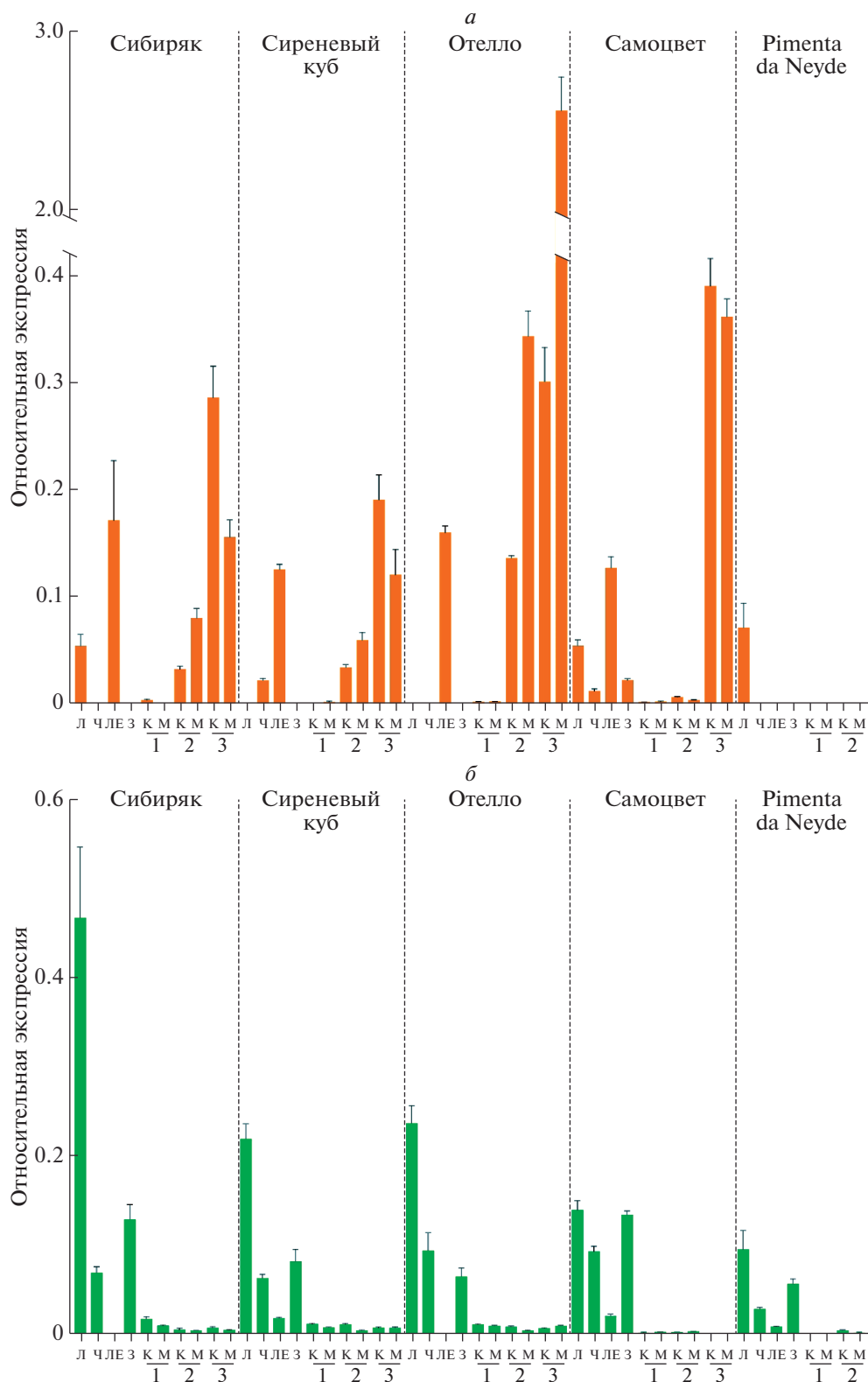


Рис. 5. Относительная экспрессия гена *PSY1* (а) и *PSY2* (б) в листьях (Л), чашелистиках (Ч), лепестках (ЛЕ), завязи (З), кожице (К) и мякоти (М) плодов на трех стадиях созревания (1 – незрелый плод финального размера (MF), 2 – бланжевый плод (IR), 3 – плод биологической спелости (RF)) образцов перца *C. annuum* (Сибиряк, Сиреневый куб, Отелло), *C. frutescens* (Самоцвет) и *C. chinense* (Pimenta da Neyde). Значения, не имеющие достоверного отличия ($P_{value} > 0.05$): *PSY1* – ЛЕ vs. М3 (Сибиряк, Сиреневый куб), К1 vs. М1 (Отелло); *PSY2* – К2 vs. М2 и К2 vs. М3 (Сибиряк), М1 vs. К3, М1 vs. М3 и К3 vs. М3 (Сиреневый куб), М1 vs. М3 (Отелло), Л vs. З (Самоцвет).

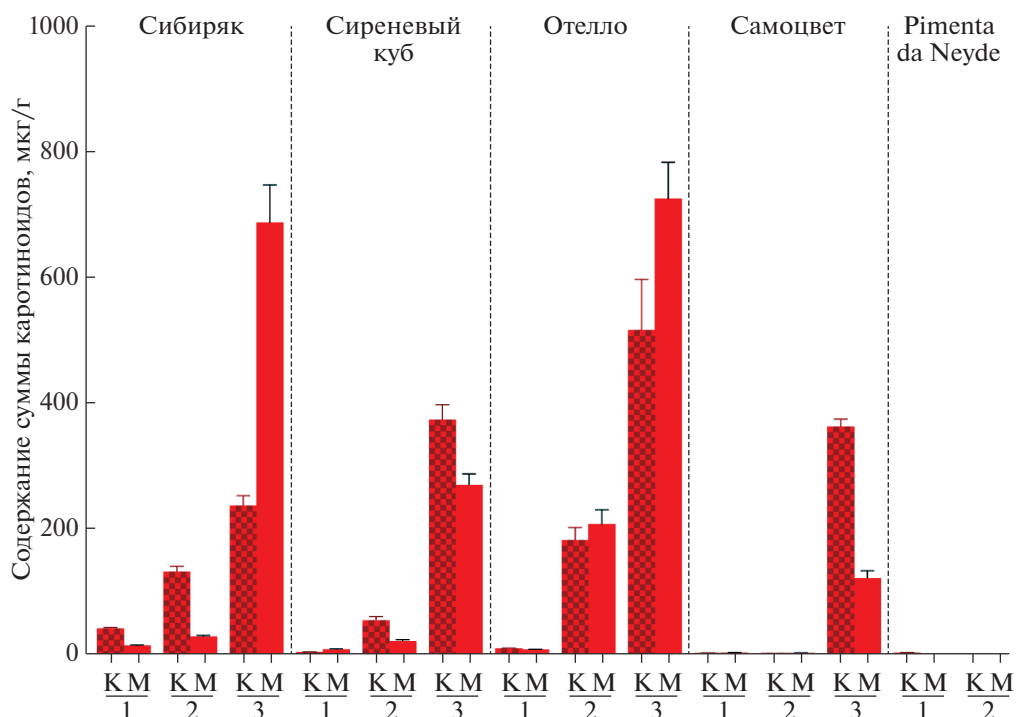


Рис. 6. Содержание суммы каротиноидов (мкг/г сырой массы) в кожце (К) и мякоти (М) плодов анализируемых сортов перца на трех стадиях созревания (1 – незрелый плод финального размера (MF), 2 – бланжевый плод (IR), 3 – плод биологической спелости (RF)).

ense) экспрессия *PSY1* выявлена исключительно в листьях (рис. 5).

Экспрессия гена *PSY2* была выявлена во всех анализируемых органах всех пяти сортов перца (рис. 5). Как ожидалось, максимальный уровень транскрипции был выявлен в листьях и несколько ниже – в чашелистиках и завязи, а в кожце и мякоти плодов уровень экспрессии *PSY2* был минимален. У сортов Сиреневый куб, Самоцвет и Pimenta da Neyde значительные количества транскриптов *PSY2* были детектированы в лепестках, при этом у первых двух сортов уровни транскрипции были сопоставимы (0.017 и 0.019), а у сорта Pimenta da Neyde – ниже в 2 раза (0.009).

Следует отметить, что анализируемые образцы значительно различались по уровню экспрессии *PSY2* в листьях. Так, самый высокий уровень транскрипции *PSY2* в листьях был показан для сорта Сибиряк, тогда как остальные сорта имели в 2–4 раза меньшее количество транскриптов *PSY2*. В целом экспрессия *PSY2* в листьях сортов *C. annuum* была выше, чем у *C. chinense* и *C. frutescens* (рис. 5). Интересно, что в чашелистиках (другой фотосинтезирующий орган) и завязи уровни экспрессии *PSY2* также различались, но при этом не коррелировали с уровнями экспрессии в листьях (рис. 5).

Содержание пигментов в перикарпе плодов анализируемых образцов видов *Capsicum*; взаимосвязь содержания суммы каротиноидов и уровня экспрессии *PSY*

Содержание суммы каротиноидов было определено в перикарпе (кожце и мякоти) плодов в процессе созревания (три стадии: незрелый плод; бланжевая спелость; биологическая спелость) пяти образцов исследуемых видов перца (рис. 6).

Спелый плод образцов перца, за исключением сорта Pimenta da Neyde, характеризовался высоким содержанием каротиноидов в кожце (236–514 мкг/г сырой массы) и мякоти (121–723 мкг/г) (рис. 6). В спелых плодах Pimenta da Neyde были обнаружены только следовые количества каротиноидов (менее 2 мкг/г). Можно предположить, что красный спелый плод четырех анализируемых сортов содержит типичные для перцев красные пигменты – каротиноиды капсантин и капсорубин [8, 26], при этом принадлежность к определенному виду *Capsicum* (*C. annuum* или *C. frutescens*) никак не связана с количеством накапливаемых каротиноидов. В зрелом плоде сорта Pimenta da Neyde (*C. chinense*) пигментация исключает каротиноиды и формируется за счет антоцианов [37].

Полученные результаты сравнили с профилем экспрессии гомологов гена *PSY1*, экспрессия которого характерна преимущественно для созревающих плодов. Было показано, что увеличе-

ние уровней транскрипции *PSY1* в перикарпе плодов перца сопровождается увеличением содержания каротиноидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы перца, исследуемые в настоящей работе, представляют три близкородственных вида — *C. annuum*, *C. chinense* и *C. frutescens*, которые вместе составляют кладу *Annuum* [24, 25]. Самыми близкими к *Annuum* являются виды клады *Baccatum*, объединяющей *C. baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* (Heiser & P.G. Sm.) Hunz. и *C. chacoense* Hunz. [24]. Геном *C. baccatum* секвенирован, что дало нам возможность использовать в сравнительном структурном анализе последовательности *PSY1* и *PSY2* *C. baccatum* в качестве представителя другой клады перцев.

Для видов комплекса *Annuum*, кроме красной финальной окраски плода, характерны два паттерна изменения окраски плода в процессе созревания: от зеленого к красному (основной паттерн); от фиолетового к красному [24, 25]. Из взятых в анализ сортов первый паттерн характерен для сорта Сибиряк (*C. annuum*). Второй паттерн наблюдается у сортов Отелло и Сиреневый куб (*C. annuum*), Самоцвет (*C. frutescens*). У сорта *Pimenta da Neyde* окраска зрелого плода не меняется и остается фиолетовой (рис. 1), так как в кожуре и мякоти не происходит накопления окрашенных каротиноидов. В результате в анализ были взяты четыре сорта с типичным для видов перца комплекса *Annuum* каротиноидным паттерном пигментации плода и один сорт с аномальной каротиноидной пигментацией.

Нами были идентифицированы гены *PSY1* и *PSY2* у пяти сортов перца видов клады *Annuum*. Сравнительный анализ выявил низкий уровень нуклеотидной варибельности для гомологов каждого гена. Необычным оказалось то, что большая часть (>30%) выявленных SNPs была сконцентрирована в экзонах. Однако при этом какие-либо критичные структурные различия гомологов как между видами *Annuum*, так и в сравнении с *C. baccatum* отсутствовали. Последовательности генов не содержали никаких нонсенс-мутаций. При этом единичные случаи радикальных миссенс-мутаций (*PSY1*, Отелло; *PSY2*, Сиреневый куб и *Pimenta da Neyde*) не влияли на фолдинг и активные центры белков (согласно Phyte2) и не входили в список мутаций, выявленных ранее при анализе 94 образцов перца и присутствие которых могло бы изменить активность фитоинсиназ [38].

В целом идентифицированные последовательности перца *PSY1* и *PSY2* были высоко гомологичны (идентичность 82%), и основным отличием *PSY1* от *PSY2* стало отсутствие на его N- и C14-конце вставок 8 и 7 а.о. соответственно. Подобные различия характерны и для *PSY*-белков других видов растений. Так, ранее для фитоинсиназ злаковых

было предположено, что отсутствие/наличие таких вставок может коррелировать с локализацией белков в пластидах конкретного типа [18]. С другой стороны, данное мнение частично опровергается тем фактом, что *PSY2* может компенсировать отсутствие *PSY1* в плоде перца и, следовательно, *PSY2* может работать не только в хлоропластах, но и в хромопластах [38, 39].

Выявленное высокое структурное сходство белков *PSY1* и *PSY2* у видов перца, в том числе у видов разных клад, предполагает, что и функции гомологов данных белков высоко консервативны среди сортов/видов перца. С достаточной степенью уверенности можно сказать, что по аналогии с тканеспецифичным каротиногенозом у томата *S. lycopersicum* идентифицированные нами гены перца могут определять биосинтез каротиноидов в созревающих плодах (гомологи *PSY1*), фотосинтезирующих тканях (гомологи *PSY2*) и лепестках (*PSY1* и *PSY2* совместно).

Различные сорта *Capsicum* классифицируются в основном по морфологическим характеристикам плода, в частности по его окраске, определяемой пигментами, главным образом присутствием и соотношением различных каротиноидов [29]. Динамика изменения окраски меняется по мере созревания плода, при этом синтез каротиноидов идет постоянно. До стадии MF окраска плода либо зеленая (хлоропласты преобладают и хлорофиллы маскируют присутствие каротиноидов), либо фиолетовая (помимо хлоропластов с хлорофиллом и каротиноидами в вакуолях накапливаются антоцианы). По мере созревания (стадии IR, RF) в образующихся хромопластах накапливается сложная смесь каротиноидов, от состава которой зависит окончательная окраска зрелого плода — зелено-коричневая, желтая, оранжевая, красная и/или темно-красная [29, 40].

Среди сортов, взятых в настоящее исследование, Сибиряк (*C. annuum*) формирует зеленый MF плод, а четыре остальных сорта — фиолетовый. По мере созревания плод сорта Сибиряк меняет окраску с зелено-красной (IR-плод) на темно-красную (RF-плод). Исходно фиолетовые плоды сортов Отелло, Сиреневый куб (оба — *C. annuum*) и Самоцвет (*C. frutescens*) меняют окраску с красного/оранжевого оттенка (IR) на красный (RF). Окраска плода у сорта *Pimenta da Neyde* (*C. chinense*) — фиолетовая на всех стадиях созревания.

Изменение окраски плода по мере его созревания может определяться различной активностью фитоинсиназы *PSY1*. Однако у всех пяти анализируемых образцов, вне зависимости от паттерна пигментации плода и видовой принадлежности, какие-либо радикальные структурные различия между идентифицированными *PSY1* отсутствуют. Это предполагает, что разный уровень биосинтеза каротиноидов в плодах данных образцов зависит не от активности фермента *PSY1*, а от уровня транскрипции кодирующего его гена. И действительно, уровень экспрессии гомологов гена *PSY1*

в плодах анализируемых сортов перца прямо коррелировал с содержанием каротиноидов и приобретаемой ими по мере созревания окраской. Так, отсутствие транскриптов *PSY1* и крайне низкая экспрессия *PSY2* в плодах Pimenta da Neyde (*C. chinense*) коррелирует с зеленой окраской мякоти плода и следовыми количествами каротиноидов. В то же время наиболее высокий уровень экспрессии *PSY1* в перикарпе плода сорта Отелло (*C. annuum*) соответствует темно-красной окраске зрелого плода, по-видимому, за счет более активного синтеза и накопления красных каротиноидов.

Считается, что *PSY1* является хромопласт-специфичной фитоинсинтазой [14]. Однако в нашем случае существенная экспрессия *PSY1* наблюдалась в листьях и чашелистиках у ряда образцов (Сибиряк, Самоцвет и Pimenta da Neyde). При этом образцы различались по уровню экспрессии гена (рис. 5). Полученные результаты на перцах совпадают с данными по томату и люцерне, где также была показана транскрипция *PSY1* в фотосинтезирующих органах [3]. С учетом сказанного, а также принимая во внимание способность *PSY2* компенсировать *PSY1* [39], можно предположить аналогичные возможности *PSY1* по отношению к *PSY2* и говорить о влиянии совокупного уровня экспрессии *PSY2* и *PSY1*.

Интересно, что полученные нами паттерны экспрессии *PSY1* в тканях перца в целом повторяют профиль транскрипции *PSY1* *S. lycopersicum* [7], чего нельзя сказать о *PSY2* (рис. 5). Максимальное число транскриптов *PSY2* присутствует в лепестках томата, при этом в листьях, чашелистиках и завязи данный ген экспрессируется заметно слабее [7]. У перца же наибольший уровень транскрипции *PSY2* был обнаружен нами в листьях (рис. 5). Мы полагаем, что подобные различия лежат в основе разной пигментации лепестков цветка томата (желтые) и перца клады *Annuum* (белые/фиолетовые) [23, 29]. Дополнительным тому подтверждением является то, что подавление экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* приводит к почти белой окраске лепестков цветка томата [41].

Таким образом, в настоящем исследовании у пяти образцов трех видов перца клады *Annuum* идентифицированы и охарактеризованы гомологи генов фитоинсинтаз *PSY1* и *PSY2*, определен профиль ко-экспрессии этих генов в вегетативных и репродуктивных органах и проведена оценка его корреляции с содержанием каротиноидов в плодах. Высокое структурное сходство гомологов между собой свидетельствует о сохранении ими консервативных ключевых функций фитоинсинтаз в синтезе каротиноидов. Отсутствие замещений в функционально значимых участках анализируемых гомологов *PSY* свидетельствует о корректном транспорте, фолдинге и активности этих ферментов. Показана экспрессия *PSY1* не только в плодах, но также и в фотосинтезирующих органах. Предполагается, что изменения в экспрессии *PSY1* и *PSY2* связаны с полиморфизмом регуля-

торных областей. Сделано предположение о существовании взаимной функциональной компенсации ферментами *PSY1* и *PSY2* функций друг друга. Подтверждена прямая корреляция между уровнем экспрессии гена *PSY1* и содержанием каротиноидов и, как следствие, с каротиноидной пигментацией плода в процессе созревания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-16-00016, с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. Carotenoids and photosynthesis // In Carotenoids in Nature / Ed. Stange C. Basel, Switzerland: Springer, 2016. P. 111–139.
2. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 165–185.
3. Stauder R., Welsch R., Camagna M. et al. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE SYNTHASE* gene family // Front Plant Sci. 2018. V. 9. Article 255. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00255>
4. Sun T., Li L. Toward the ‘golden’ era: The status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants // Plant Sci. 2020. V. 290. Article 110331. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110331>
5. Rudall P.J. Colourful cones: how did flower colour first evolve? // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. № 3. P. 759–767. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz479>
6. Dardick C., Callahan A.M. Evolution of the fruit endocarp: Molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies // Front Plant Sci. 2014. V. 5. Article 284. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00284>
7. Giorio G., Stigliani A.L., D’Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns // FEBS J. 2008. V. 275. № 3. P. 527–535. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x>
8. Rodriguez-Urbe L., Guzman I., Rajapakse W. et al. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 1. P. 517–526. <https://doi.org/10.1093/jxb/err302>
9. Liu L., Shao Z., Zhang M., Wang Q. Regulation of carotenoid metabolism in tomato // Mol. Plant. 2015. V. 8. P. 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.006>
10. Yoo H.J., Park W.J., Lee G.M. et al. Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid

- profiling // *Molecules*. 2017. V. 22. № 5. Article E764. <https://doi.org/10.3390/molecules22050764>
11. *Ahrazem O., Diretto G., Argandoña Picazo J. et al.* The specialized roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron // *Front Plant Sci*. 2019. V. 10. Article 249. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00249>
 12. *Zhou X., Welsch R., Yang Y. et al.* *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 11. P. 3558–3563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420831112>
 13. Tomato Genome Consortium (*Sato S., Tabata S., Hirakawa H. et al.*). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // *Nature*. 2012. V. 485. P. 635–641.
 14. *Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O., Scolnik P.A.* A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway // *J. Biol. Chem*. 1992. V. 267. P. 5036–5039.
 15. *Ducreux L.J., Morris W.L., Hedley P.E. et al.* Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of b-carotene and lutein // *J. Exp. Bot*. 2005. V. 56. P. 81–89.
 16. *Fraser P.D., Enfissi E.M., Halket J.M. et al.* Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 3194–3211.
 17. *Bartley G.E., Scolnik P.A.* cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. P. 25718–25721.
 18. *Gallagher C.E., Matthews P.D., Li F., Wurtzel E.T.* Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses // *Plant Physiol*. 2004. V. 135. №3. P. 1776–1783.
 19. *Fraser P.D., Schuch W., Bramley P.M.* Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties // *Planta*. 2000. V. 211. P. 361–369.
 20. *Cao H., Luo H., Yuan H. et al.* A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases // *Plant Physiol*. 2019. V. 180. № 4. P. 1988–2003. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00384>
 21. *Giovannoni J., Nguyen C., Ampofo B. et al.* The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening // *Annu. Rev. Plant Biol*. 2017. V. 68. P. 61–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906>
 22. *Peralta I.E., Spooner D.M.* History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*) // *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*. V. 2: Tomato / Eds Razdan M.K., Mattoo A.K. Science Publ. Enfield, CT, 2007. P. 1–27.
 23. *Galpaz N., Ronen G., Khalfa Z. et al.* A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white flower locus // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1947–1960.
 24. *Carrizo García C., Barfuss M.H., Sehr E.M. et al.* Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*) // *Ann. Bot*. 2016. V. 118. № 1. P. 35–51. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw079>
 25. *Barboza G.E., Carrizo García C., Leiva González S. et al.* Four new species of *Capsicum* (*Solanaceae*) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus // *PLoS One*. 2019. V. 14. Article e0209792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>
 26. *Berry H.M., Rickett D.V., Baxter C.J. et al.* Carotenoid biosynthesis and sequestration in red chilli pepper fruit and its impact on colour intensity traits // *J. Exp. Bot*. 2019. V. 70. № 10. P. 2637–2650. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz086>
 27. *Deruère J., Römer S., d'Harlingue A. et al.* Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures // *Plant Cell*. 1994. V. 6. P. 119–133.
 28. *Kilcrease J., Rodriguez-Uribe L., Richins R.D. et al.* Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annum* fruit pericarp // *Plant Sci*. 2015. V. 232. P. 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.014>
 29. *Mohd Hassan N., Yusof N.A., Yahaya A.F. et al.* Carotenoids of *Capsicum* fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes // *Antioxidants (Basel)*. 2019. V. 8. № 10. Article E469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
 30. *Fraser P.D., Truesdale M.R., Bird C.R. et al.* Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression) // *Plant Physiol*. 1994. V. 105. № 1. P. 405–413. <https://doi.org/10.1104/pp.105.1.405>
 31. *Lichtenhaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol*. 1987. V. 148. P. 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
 32. *Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V.* A spectrophotometric analysis of pigments in apples // *Rus. J. Plant Phys*. 2001. V. 48. № 5. P. 693–700.
 33. *Puchooa D.* A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) // *Afr. J. Biotech*. 2004. V. 3. P. 253–255.
 34. *Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.* Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов // *Физиол. растений*. 2020. Т. 67. № 6. С. 644–653.
 35. *Bemer M., Karlova R., Ballester A.R. et al.* The Tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 4437. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103283>
 36. *Liu C.I., Liu G.Y., Song Y. et al.* A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence // *Science*. 2008. V. 319. P. 1391–1394.
 37. *Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.* Особенности экспрессии гена фактора транскрипции *anthocyanin2* и его влияния на содержание антоцианов у образцов *Capsicum chinense* Jacq. с различной окраской плода // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1161–1170.
 38. *Jeong H.B., Kang M.Y., Jung A. et al.* Single-molecule real-time sequencing reveals diverse allelic variations in carotenoid biosynthetic genes in pepper (*Capsicum* spp.) // *Plant Biotechnol. J*. 2019. V. 17. № 6. P. 1081–1093. <https://doi.org/10.1111/pbi.13039>
 39. *Jang S.J., Jeong H.B., Jung A. et al.* Phytoene synthase 2 can compensate for the absence of *Psy1* in *Capsicum* fruit // *J. Exp. Bot*. 2020. Article eraa155. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa155>

40. Liu Y., Lv J., Liu Z. et al. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) // Food Chem. 2020. V. 306. Article 125629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125629>

41. Fray R.G., Grierson D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression // Plant Mol. Biol. 1993. V. 22. P. 589–602.

ПРИЛОЖЕНИЕ

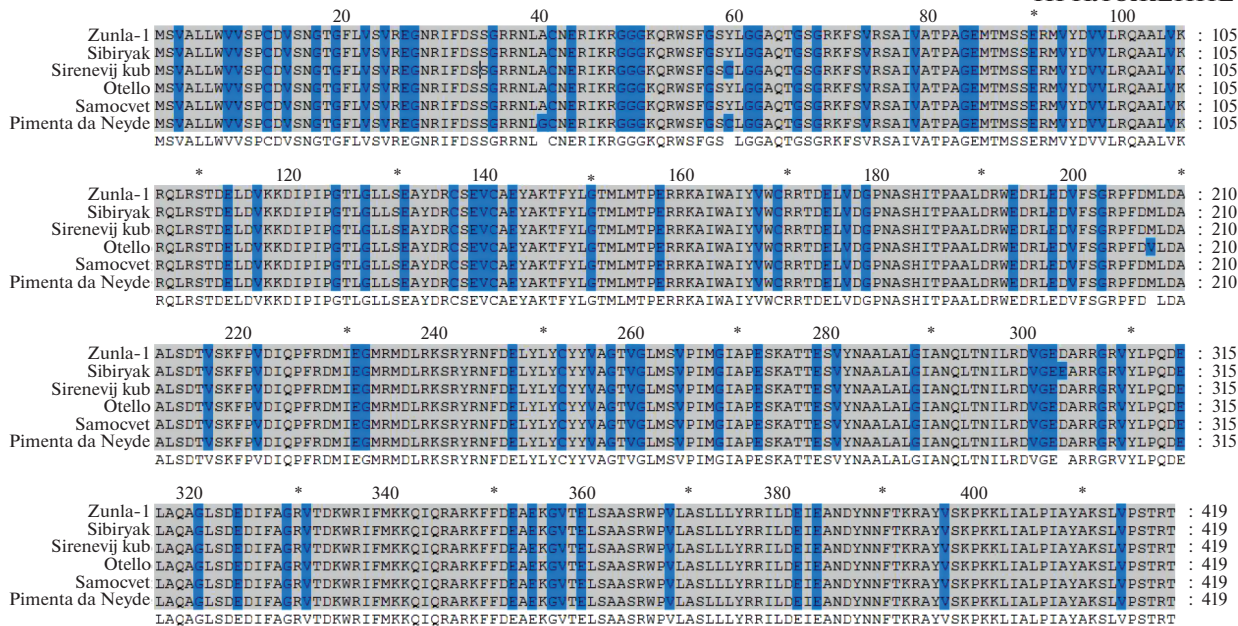


Рис. S1. Аминокислотные последовательности PSY1 анализируемых сортов перца и сорта Zunla-1 (*C. annuum*; NP_013111896.1).

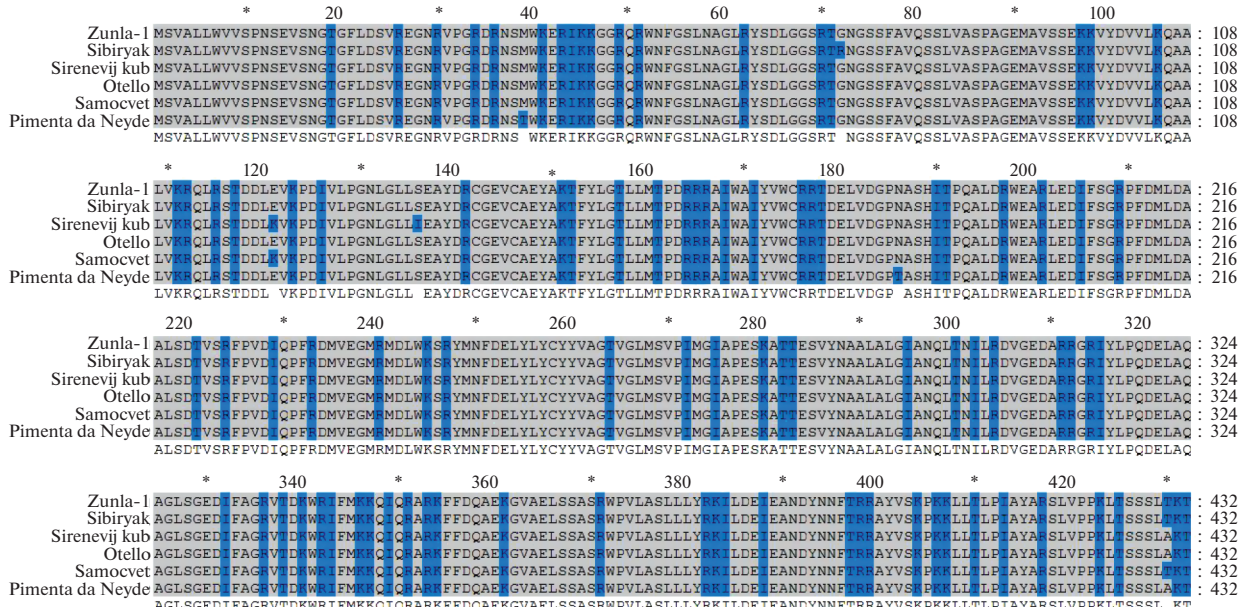


Рис. S2. Аминокислотные последовательности PSY2 анализируемых сортов перца и сорта Zunla-1 (*C. annuum*; XP_016560212.1).

Variability and Expression Pattern of Phytoene Synthase (PSY) Paralogs in Pepper Species

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

^aInstitute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

In this study, the *PSY1* and *PSY2* homologous genes were identified in five accessions of three pepper species *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* and *Capsicum frutescens*, differing in fruit pigmentation pattern. Within the studied pepper accessions, in the *PSY1/PSY2* genomic sequence variability was determined. The *PSY1* and *PSY2* sequences were 82% similar and differed in the N- and C-terminal NAGLRYSD and KLTSSSL indels, as well as in the conserved motifs characteristic of the *PSY2* and *PSY1* homologs. The *PSY1* and *PSY2* expression was analyzed in leaves, sepals, petals, ovaries, as well as in the peel and pulp of the fruits at the three stages of ripening in all five analyzed accessions. The maximum level of *PSY1* expression was shown in the petals, and in the pericarp of mature fruits of *C. annuum* and *C. frutescens* accessions. In the *C. chinense* accession, *PSY1* was expressed only in leaves. *PSY2* transcripts were found in all analyzed organs of all pepper accessions; the maximum level was in the leaves, and the minimum level was in the fruit pericarp. The obtained data suggest that the *PSY1* and *PSY2* homologs of pepper species retained conserved key functions in the carotenoid synthesis in fruits (*PSY1*) and photosynthetic tissues (*PSY2*).

Keywords: phytoene synthase, *PSY1*, *PSY2*, *Capsicum*, pepper species, fruit colour.