

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ АНТОЦИАНИДИН-3-О-ГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ ПЕРЦА (*Capsicum* spp.) И ИХ РОЛЬ В БИОСИНТЕЗЕ АНТОЦИАНОВ

© 2023 г. М. А. Филюшин¹*, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹

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

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 22.08.2022 г.

Принята к публикации 31.08.2022 г.

В растении перца (*Capsicum* spp.) антоцианы важны не только для защиты фотолabileльных соединений, но и для регуляции паттерна окраски плода. Ключевая роль в биосинтезе стабильных антоцианов принадлежит антоцианидин-3-О-глюкозилтрансферазам (UFGT). В данной работе охарактеризована структура и филогения трех генов-гомологов *UFGT* перца. Биохимический анализ сортов *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и сорта *C. frutescens* (Самоцвет), различающихся паттерном пигментации плода в процессе созревания, показал наличие антоцианов в листьях и кожце плода всех образцов (кроме плода сорта Сибиряк). Наибольшее содержание обнаружено в фиолетовых листьях сорта Самоцвет. В кожце плода всех образцов содержание антоцианов падало по мере созревания. Экспрессионный анализ тех же тканей показал, что транскрипты генов *UFGT1* (*LOC107843659*) и *UFGT2* (*LOC107843660*) присутствуют в листьях всех сортов. В кожце плода транскрипты *UFGT1* детектированы на стадиях созревания 1 (Сиреневый куб и Отелло) и 1–3 (Самоцвет), тогда как транскрипты *UFGT2* – во всех образцах с наибольшим значением у сорта Сибиряк, где антоцианы отсутствовали. Транскрипты генов MBW-комплекса (*anthocyanin2*, *MYC* и *WD40*), регулирующего биосинтез антоцианов, присутствовали в листьях всех сортов с максимумом в фиолетовых листьях сорта Самоцвет. Сопоставление биохимических и экспрессионных данных выявило положительную корреляцию количества антоцианов в кожце плодов и в листьях с уровнем транскриптов гена *UFGT1*. Для гена *UFGT2* корреляции не выявлено. Секвенирование и анализ гена *UFGT1*, включая промоторную область, у 18 сортов перца, различающихся паттерном окраски плода, обнаружил инвариантность последовательности, независимо от окраски незрелого плода. Анализ промоторов генов *UFGT1* и *UFGT2* показал различия в составе *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы, гормоны и связывание с транскрипционными факторами семейств MYB и MYC.

Ключевые слова: *Capsicum* spp., сорта перца, биосинтез антоцианов, антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераза, *UFGT*, содержание антоцианов, экспрессия гена.

DOI: 10.31857/S0016675823050041, **EDN:** FNOPBO

Перец (род *Capsicum*) является важнейшей овощной культурой с ежегодным мировым производством более 36 млн т (<https://www.fao.org/faostat>). Плоды перца богаты питательными веществами и антиоксидантами (аскорбат, каротиноиды и флавоноиды) [1], что делает их важной составляющей диеты человека. К роду *Capsicum* относится, по разным оценкам, от 30 до 35 видов [2, 3], из которых широко культивируются только пять – *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* и *C. pubescens*.

Окраска плода перца определяется комбинацией хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов и меняется по мере созревания. Исходно зеленая или фиолетовая у незрелого плода она становится

красной, желтой или оранжевой у спелого плода, что происходит за счет снижения содержания хлорофиллов и антоцианов и накопления каротиноидов [4–6]. При этом, если каротиноиды могут накапливаться только в плодах, благодаря преобразованию хлоропластов в хромопласты, то антоцианы, аккумулируясь в вакуолях, могут влиять на пигментацию не только плодов, но также корней, листьев, стеблей и цветковых органов.

Антоцианы относятся к водорастворимым флавоноидам и представляют собой соединение антоцианидина с молекулой сахара и ацильной группой; сами антоцианидины состоят из двух ароматических бензольных колец и оксигениро-

ванного гетероцикла [7, 8]. У растений путь биосинтеза антоцианов высоко консервативен. Девять ферментативных реакций приводят к образованию из фенилаланина антоцианидинов (пеларгонидин, цианидин и дельфинидин), к которым затем присоединяются молекулы сахара для получения стабильных и водорастворимых пигментов [8, 9]. Перенос глюкозильной части UDP-глюкозы на 3-гидроксильную группу антоцианидинов катализируется антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазой (3GT или UFGT (UDP-глюкозо-флавоноид-глюкозилтрансфераза)) [10, 11]. В активации экспрессии структурных генов пути синтеза антоцианидинов задействован так называемый MBW-комплекс, состоящий из транскрипционных факторов anthocyanin2 (R2R3-MYB), MYC (bHLH) и WD40 (WD-repeat) [9, 11–14].

Антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы имеют решающее значение для биосинтеза антоцианов в плодах растений. В геноме перца *C. annuum* сорта Zunla-1 (PRJNA186921) аннотированы три гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз (*Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*), тандемно расположенные на хромосоме 10 [15]. Первый из них (*CaUFGT*; FJ705848) считается наиболее важным для биосинтеза антоцианов в плоде [5]. Однако в референсном геноме перца *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1, PRJNA376668) аннотировано только два гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз — *LOC107843659* (*UFGT*) и *LOC107843660*, которые соответствуют последовательностям *Capana10g001978* и *Capana10g001980* [15].

Показана положительная корреляция между экспрессией кодирующих антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы генов и содержанием антоцианов. Например, транскрипты гена *3GT* присутствуют в красных ягодах винограда (*Vitis vinifera* L.) и отсутствуют в белых ягодах [16]. У личи (*Litchi chinensis* Sonn.) содержание антоцианов в околоплоднике коррелирует с уровнем транскриптов *3GT*, причем взаимосвязи с транскрипцией других генов флавоноидного пути не обнаружено [10]. В плодах перца *C. annuum* также обнаружена прямая зависимость количества антоцианов от уровня экспрессии гена *CaUFGT* [5, 6].

В данной работе нами были определены профили экспрессии генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*Capana10g001978*; *LOC107843659*) и *UFGT2* (*Capana10g001980*; *LOC107843660*) в листьях и плодах сортов перца с различным паттерном пигментации плода в процессе созревания, а также генов MBW-комплекса в листьях данных сортов. Был проведен анализ корреляций между экспрессией генов *UFGT1* и *UFGT2* с содержанием антоцианов в плодах и листьях перца, а также поиск возможных полиморфных вариантов в регуляторных и кодирую-

щих последовательностях гена *UFGT1*, ассоциированных с различиями в окраске плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе были использованы образцы 18 сортов перца из коллекции Федерального научного центра овощеводства (Московская обл., поселок ВНИИССОК) (табл. 1). Сорта представляли два основных паттерна окраски плода: “незрелый плод/спелый плод” — “зеленый/красный (или желтый, оранжевый)” и “фиолетовый/красный (или желтый, оранжевый)”. Из листьев всех образцов выделяли геномную ДНК. Для анализа экспрессии генов и содержания антоцианов у сортов Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк отбирали листья и кожицу (экзокарп) плода на трех стадиях его развития. Стадия 1 (**MG**, mature green) соответствовала незрелому плоду, достигшему конечного размера; стадия 2 (**BR**, breaker) — бланжевому плоду (переход от незрелого к спелому плоду, сопровождающийся постепенным изменением окраски); стадия 3 (**FR**, fully ripe) — плоду биологической зрелости (финальная окраска; семена полностью сформированы) (рис. 1).

Определение содержания антоцианов. Содержание суммы антоцианов (в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид) в листьях и кожице плодов, предварительно растертых в жидком азоте, определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, в двух биологических и трех технических повторах, согласно методике [17].

Выделение ДНК, амплификация последовательностей. Из листьев образцов перца с помощью СТАВ-буфера: 100 мМ Tris (pH = 8.0), 20 мМ ЭДТА (pH = 8.0), 2 М NaCl, 2% PVP, 5% меркаптоэтанол (w/v), 2% СТАВ (w/v), 10 мМ ацетата аммония — выделяли геномную ДНК. 100 мг растительной ткани гомогенизировали в 500 мкл СТАВ-буфера, затем добавляли один объем хлороформа и центрифугировали (13000 об.) в течение 10 мин, далее отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней 250 мкл изопропанола и центрифугировали (13000 об.) в течение 10 мин; осадок ДНК промывали трижды в 100 мкл 70%-ного этанола, высушивали (70°C) и растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

Амплификацию гена *Capana10g001978* (включая промоторную область, 1000 пн) проводили с использованием геномной ДНК в качестве матрицы и разработанных праймеров (табл. 2). Ампликоны секвенировали с помощью ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН). Полученные последовательности депонировали в NCBI (OR066796—OR066813). Структурно-филогенетический анализ последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Концеп-

Таблица 1. Образцы перца, использованные в работе

Образец: вид, сорт	Окраска плода в процессе созревания		
	стадия 1 (MG)	стадия 2 (BR)	стадия 3 (FR)
<i>C. annuum</i> , Антей	Зеленая	Зеленая	Красная
<i>C. annuum</i> , Ария	Темно-зеленая	Темно-зеленая	Оранжевая
<i>C. annuum</i> , Гогошары	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
<i>C. annuum</i> , Гранат	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Темно-красная
<i>C. annuum</i> , Желтый букет	Зеленая	Зеленая с желтыми сегментами	Желтая
<i>C. annuum</i> , Кармин	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
<i>C. annuum</i> , Королевский	Зеленая	Зеленая	Желтая
<i>C. annuum</i> , Медок	Зеленая	Зеленая	Желтая
<i>C. annuum</i> , Мечта хозяйки	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
<i>C. annuum</i> , Мила	Зеленая	Зеленая	Красная
<i>C. annuum</i> , Мулат	Зеленая	Темно-зеленая	Коричнево-красная
<i>C. annuum</i> , Оранжевое наслаждение	Зеленая	Светло-зеленая	Оранжевая
<i>C. annuum</i> , Отелло	Фиолетовая	Красно-фиолетовая	Красная
<i>C. annuum</i> , Пурпурный	Фиолетовая	Фиолетово-зеленая	Красная
<i>C. annuum</i> , Сибиряк	Зеленая	Красная с зелеными сегментами	Красная
<i>C. annuum</i> , Сиреневый куб	Фиолетовая	Фиолетово-красная	Красная
<i>C. annuum</i> , Янтарь	Фиолетово-зеленая	Зеленая	Оранжевая
<i>C. frutescens</i> , Самоцвет	Фиолетовая	Светло-желтая	Красная

вативные домены и мотивы в белках определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.4.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). Поиск cis-регуляторных элементов проводили с помощью программы PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Выделение РНК, синтез кДНК. Суммарную РНК из листьев и кожицы плодов, предварительно растертых в жидком азоте, выделяли и очищали от примесей ДНК с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNase set (QIAGEN, Германия). Полученные препараты использовали для синтеза кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System; Promega, США).

Определение профиля экспрессии генов. Профиль экспрессии генов *Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980* (в листьях и кожице плодов), а также *anthocyanin2*, *MYC* и *WD40* (в листьях) определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием разработанных праймеров (табл. 2). Относительный уровень экспрессии генов оценивали, нормализуя его по референсным генам *GAPDH* (LOC107862704, XM_016708343.2) и *Actin7* (LOC107850541, XM_016695142.2). Для РВ-ПЦР использовали 3 нг кДНК-матрицы, набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и амплификатор CFX96 Real-Time PCR De-

tection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>). Корреляция между содержанием суммы антоцианов и уровнем экспрессии гена присутствовала, если квадрат коэффициента множественной корреляции $R^2 > 0.7$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз в геноме перца. Был проведен сравнительный анализ последовательностей генов трех антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз *Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*, идентифицированных ранее в геноме перца сорта Zunla-1 [15] в сравнении с гомологичными последовательностями, аннотированными позднее в референсном геноме *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1, PRJNA376668). Было показано, что *Capana10g001978* и *Capana10g001980* (сорт Zunla-1) идентичны *LOC107843659* и *LOC107843660* (сорт UCD-10X-F1) соответственно. Ген *Capana10g001979* гомологичен *Capana10g001980* на 99% и содержит преждевременный стоп-кодон

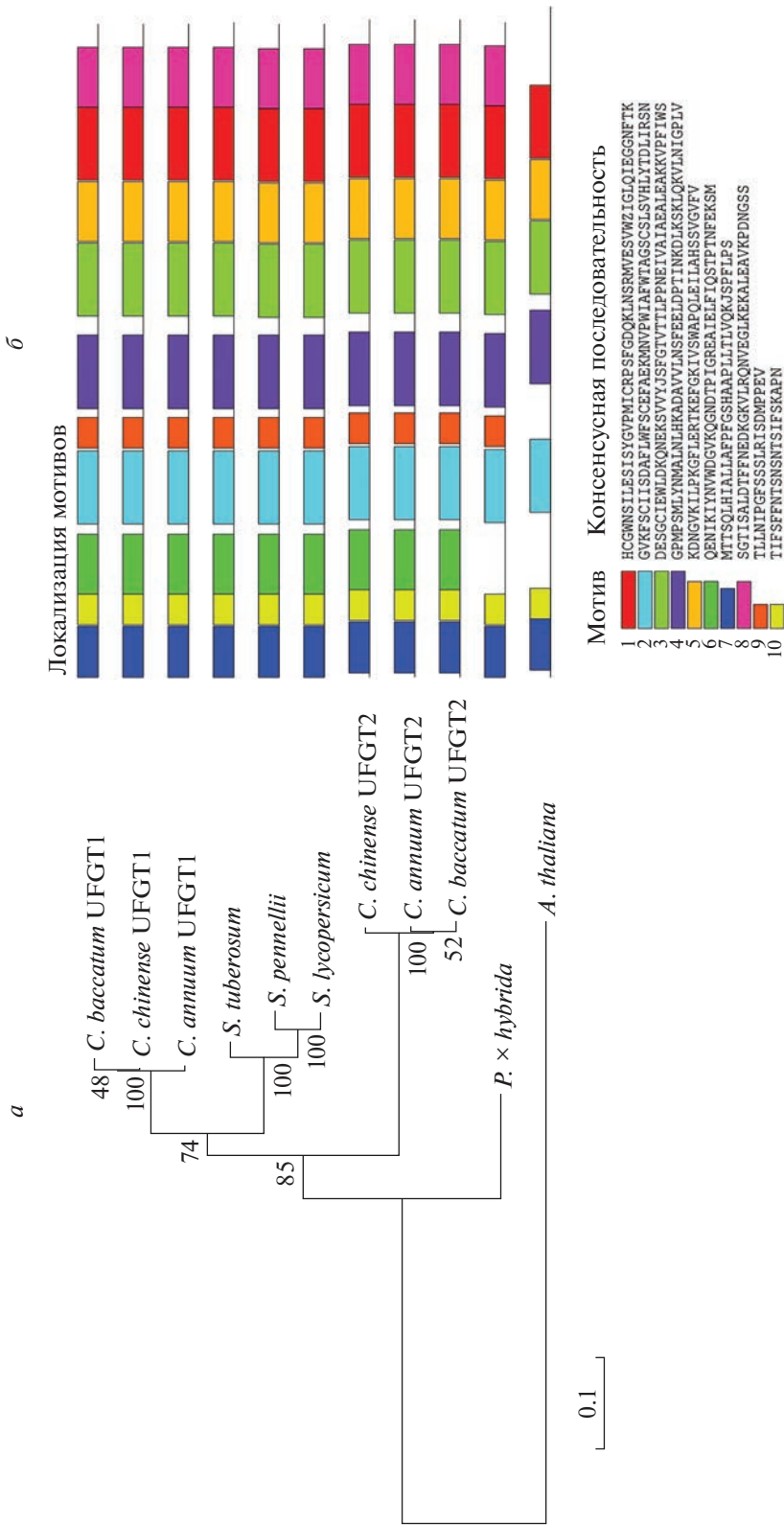


Рис. 1. Филогения (а) и схема консервативных мотивов (б) UFGT1 и UFGT2 на основе аминокислотных последовательностей антоцианидин-3-О-глюкозил-трансфераз *C. annuum* (NM 001324611.1 (UFGT1), XM 016688020.2 (UFGT2)), *C. baccatum* (CM008452.1:203206442-203207958 (UFGT1), MLFT02000010.1:203240476-203241828 (UFGT2)), *C. chinense* (CM008440.1:213246961-213248595 (UFGT1), MCIT02000010.1:213287855-213289207 (UFGT2)), *P. × hybrida* (AB027454.1), *S. lycopersicum* (XM 004249399.4), *S. pennellii* (XM 015200918.2), *S. tuberosum* (NM 001288088.1)) и *Arabidopsis thaliana* (AT5G17050, NM 121711.5). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA7.0.26 (метод Neighbor-Joining, 1000 бутстреп-реплик).

Таблица 2. Используемые в работе последовательности пар праймеров

Ген	Последовательность праймеров, 5' → 3'	Применение
<i>Capana 10g001978 (=UFGT1)</i>	CACACAATCCCAAGTGAAC TTGCCTCCCTCAAATAGTC	Амплификация и секвенирование кодирующей последовательности гена
	TTTGACACCATCCCAAACAT GAATTAGTTTGATTTCGATTTGAC	Амплификация и секвенирование регуляторной области гена
	CTTTTGGTAGCCATGCAGTTCC CACCATCCCAAACATTGTAAATC	РВ-ПЦР
<i>Capana 10g001979</i>	GGAGGAGGAAAGAGGATTTC TCACTACCACAGCAACAGCC	
<i>Capana 10g001980 (=UFGT2)</i>	GAGTGTTTGGGAGATTGGTTAC GCCTTAGAACCTTCCCTTTATCA	
<i>anthocyanin2</i>	GCAGAAAGAGCTGTAGATTGAG TCTCTTGTCGATGAGGAGCAG	
<i>MYC</i>	CAATGGGGCTATAAAGACTAGGAA GAAAAGAGAAAGAAACACACATG	
<i>WD40</i>	TCAGCCAATAGAAGGTGGATTG TCACACCCTTAGAATCTGAAGC	
<i>GAPDH</i>	GTACGACAACGAATGGGGTTA GGTCCGAGAGAACACTTTATTC	
<i>Actin7</i>	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG	

Таблица 3. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз в геноме перца *C. annuum*

Название гена антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз в данной статье	Ген ID*	Локализация в геноме*	Длина, пн	CDS, пн	Белок, а.о.	MW, кДа	pI	Домен
<i>UFGT1</i> **	<i>LOC107843659</i>	chr10:208664164..208665507	1344	1344	447	49.5	6.13	GT1_Gtf-like (6–390 а.о.)
<i>UFGT2</i>	<i>LOC107843660</i>	chr10:208704889..208706241	1353	1353	450	49.7	5.82	GT1_Gtf-like (9–447 а.о.)

Примечание. * – в геноме *C. annuum* сорта UCD-10X-F1 (PRJNA376668), ** – синоним *UFGT* или *3GT*, pI – изоэлектрическая точка.

(из-за полиморфных вариантов C132G и T413A). В референсном геноме сорта UCD-10X-F1 он соответствует не аннотированной последовательности (208673888..208675240, хромосома 10).

Анализируемые последовательности функциональных генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*LOC107843659*) и *UFGT2* (*LOC107843660*) не содержали интронов и имели сходные характеристики (табл. 3). Оба кодируемых фермента антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз

включали консервативный UDP-гликозилтрансферазный домен GT1_Gtf-like (cd03784).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков *UFGT1* и *UFGT2* различных видов *Capsicum* был проведен в сравнении с доступными гомологичными последовательностями других представителей Solanaceae (*Petunia × hybrida* и *Solanum* spp.) и модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. Было обнаружено, что геномы видов *Solanum*, петунии и *A. thaliana* содер-

жат только по одному гомологу гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз. Построенная дендрограмма показала четкую кластеризацию белков на группы UFGT1 и UFGT2 (рис. 1,а). Несмотря на то, что UFGT *A. thaliana* обладает почти равным сходством с UFGT1 и UFGT2 перца (идентичность 47.6 и 45.7% соответственно), UFGT видов *Solanum* сгруппировались с UFGT1 перца, а генетическая дистанция белков перца группы UFGT2 значительно превышает расстояние для группы UFGT1 (рис. 1,а). Анализ консервативных мотивов в белковых последовательностях не выявил структурных различий между UFGT1 и UFGT2 видов *Capsicum* и *Solanum*, однако обнаружил их отличие от UFGT петунии и *A. thaliana* в области трех мотивов: двух — в функциональном домене GT1_Gtf-like, и одного — на С-конце (рис. 1,б).

Определение содержания антоцианов и профиля экспрессии генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз у образцов перца. Для биохимического и экспрессионного анализа использовали образцы трех сортов *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и сорт *C. frutescens* (Самоцвет), различающихся паттерном пигментации плода в процессе созревания (табл. 1, рис. 2). У сортов Сиреневый куб и Отелло незрелый плод (стадия 1, MG) имеет фиолетовую окраску, которая по мере созревания сменяется на ярко-красную; листья имеют зеленую окраску. У сорта Самоцвет незрелый плод имеет ярко-фиолетовую окраску, которая затем сменяется на светло-желтую и на стадии спелости становится красной; листья имеют темно-фиолетовую окраску. Сорт Сибиряк формирует зеленые листья, незрелые плоды темно-зеленой окраски и спелые плоды ярко-красной окраски (рис. 2).

Данные биохимического анализа показали, что содержание суммы антоцианов у сортов Сиреневый куб и Отелло максимально в кожце незрелого плода (стадия 1) и по мере созревания плода снижается (рис. 3,а). У сорта Самоцвет содержание антоцианов высокое на стадиях 1 и 2 и значительно падает к стадии 3. При этом в кожце плода на стадии 2, когда плод имеет светло-желтую окраску, количество антоцианов существенно выше, чем на стадии 1, в плоде фиолетовой окраски (рис. 2, 3,а). У сорта Сибиряк антоцианы в кожце плодов не обнаружены (рис. 3,а).

Экспрессионный анализ показал, что транскрипты *UFGT1* присутствуют в кожце незрелого плода стадии 1 у сортов Сиреневый куб и Отелло и на всех трех стадиях развития у сорта Самоцвет (рис. 3,б). В кожце плодов сорта Сибиряк транскриптов *UFGT1* обнаружено не было (рис. 3,б).

Экспрессия гена *UFGT2* была выявлена в кожце плодов всех четырех сортов перца. У сортов Сиреневый куб и Самоцвет уровень транскриптов гена был высоким на стадии 1 и значительно

падал по мере созревания плода, к стадии 3 приближаясь к низкой экспрессии, характерной для всех стадий у сорта Отелло. В плодах сорта Сибиряк, не содержащих антоцианов, наблюдались самые высокие уровни транскрипции гена *UFGT2* с максимумом на стадии 2 и равной экспрессией на стадиях 1 и 3 (рис. 3,в).

В листьях наибольшее содержание суммы антоцианов было детектировано у сорта Самоцвет (~1100 мкг/г; фиолетовая окраска), тогда как у сортов Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк оно было значительно ниже (~2–12 мкг/г; зеленая окраска) (рис. 4,а).

Транскрипты гена *UFGT1* были выявлены в листьях всех анализируемых сортов, однако их уровень у сорта Самоцвет значительно (в 30–150 раз) превышал таковой у сортов Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк (рис. 4,б). Наибольший уровень экспрессии гена *UFGT2* наблюдался в листьях сорта Сиреневый куб — в 2.5 раза выше, чем у сортов Отелло, Самоцвет и Сибиряк (рис. 4,в).

Экспрессии гена *Capana10g001979* (третий гомолог антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы в геноме перца) детектировано не было ни в плодах, ни в листьях анализируемых образцов.

Дополнительно в листьях сортов перца были определены профили экспрессии генов транскрипционных факторов *anthocyanin2*, *MYC* и *WD40*. Было показано, что транскрипты всех трех генов присутствуют в листьях всех анализируемых сортов, при этом наибольшие уровни экспрессии наблюдались в фиолетовых листьях сорта Самоцвет (рис. 4,г–е).

На основе данных биохимического и экспрессионного анализа методом линейной регрессии была определена взаимосвязь уровней транскрипции генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз и содержания суммы антоцианов (рис. 5). Было выявлено, что количество антоцианов положительно коррелирует с уровнями транскриптов гена *UFGT1* как в кожце плодов, так и в листьях ($R^2 = 0.72$ и 0.99 соответственно, $p\text{-value} < 0.01$) (рис. 5,а, б). Для гена *UFGT2* такой корреляции выявлено не было ($R^2 = 0.15$ и 0.13) (рис. 5,в, г).

Определение кодирующей последовательности и промоторной области гена *UFGT1* у сортов перца. Для анализа вариативности кодирующей последовательности и промоторной области гена *UFGT1* у образцов перца, различающихся паттерном окраски плода в процессе созревания, данные последовательности были амплифицированы и секвенированы. Для анализа были использованы 17 сортов перца *C. annuum*, четыре из которых (Сиреневый куб, Пурпурный, Отелло и Янтарь) формируют фиолетовый незрелый плод, а остальные 13 — зеленый, а также сорт *C. frutescens* (Самоцвет), у которого фиолетовую окраску имеет не только незрелый плод, но и листья (табл.

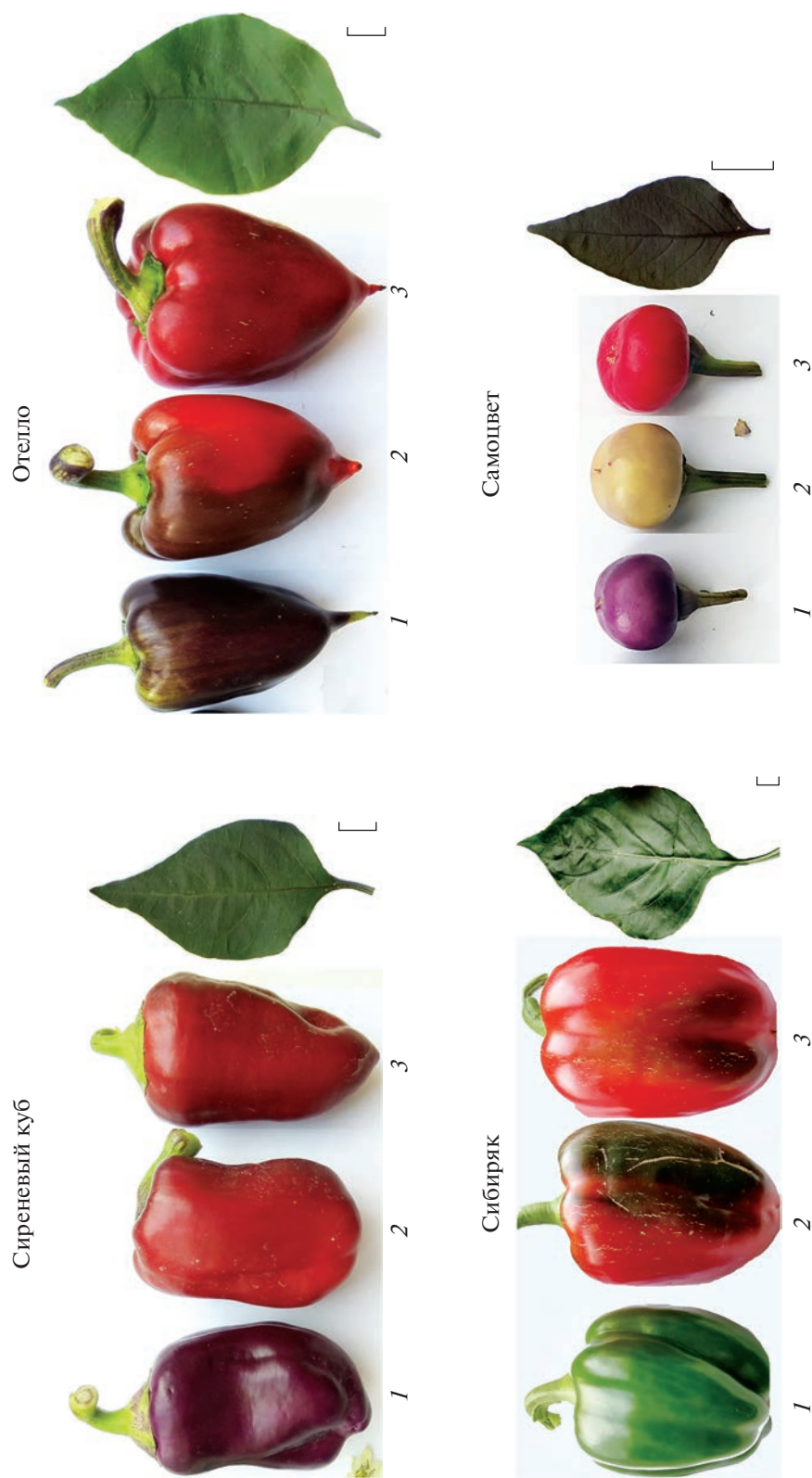


Рис. 2. Плоды сортов перца *S. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и *S. frutescens* (Самоецвет) на разных стадиях созревания: 1 и 2 соответствуют незрелому плоду (MG и BR), а 3 — плоду биологической спелости (FR). Масштабная линия (вертикальная черта справа) соответствует 1 см.

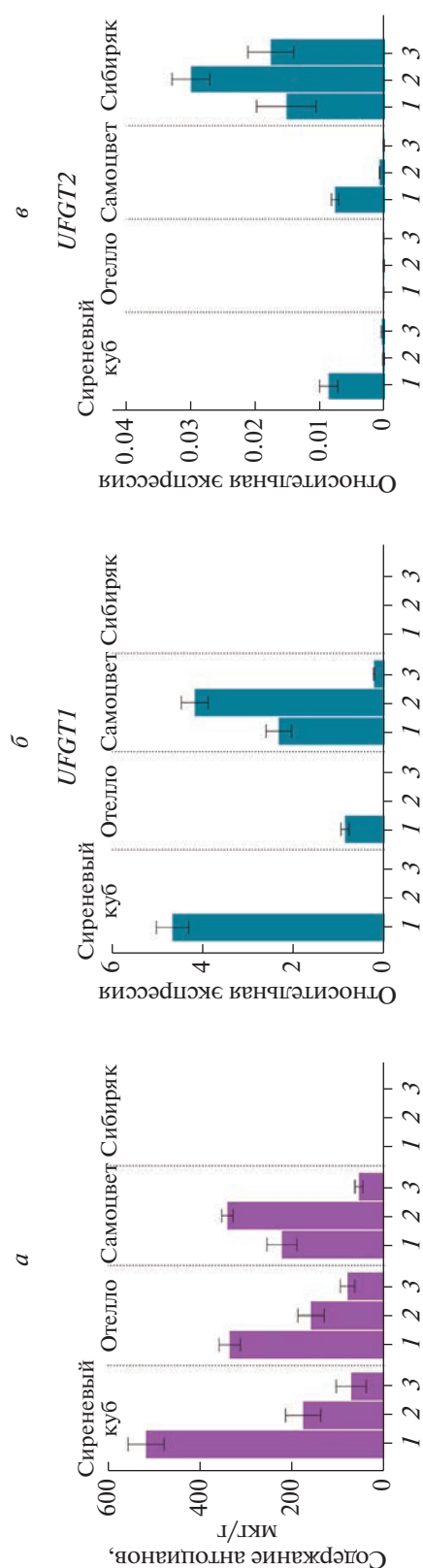


Рис. 3. Содержание антоцианов (а) и экспрессия генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (б) и *UFGT2* (в) в кожце плодов сортов перца Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк в процессе созревания (1 и 2 – незрелый плод (MG и BR), 3 – плод биологической спелости (FR)).

1). Структурный анализ полученных последовательностей выявил их инвариантность между образцами (независимо от окраски незрелого плода) и идентичность референсным последовательностям кДНК *UFGT1* (*LOC107843659*) и промоторной области (по геному сорта UCD-10X-F1). Регуляторная последовательность не содержала ни одного из полиморфизмов, обнаруженных ранее другими авторами и, по их предположениям, сцепленных с окраской плода перца, опосредованной антоцианами [15].

Cis-регуляторные элементы в промоторах генов UFGT1 и UFGT2. В промоторной области (~1000 пн) генов *UFGT1* и *UFGT2* был проведен поиск *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы и гормоны, а также являющихся сайтами связывания с транскрипционными факторами (рис. 6). В результате в промоторе гена *UFGT1* было выявлено шесть *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы (элементы ARE, W-box и WRE3) и свет (элемент box 4), а также отвечающих за связывание с транскрипционными факторами семейств MYB и MYC (элементы MYB и MYC) (рис. 6,а). В промоторе области гена *UFGT2* было найдено девять *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы (STRE, TC-rich repeats, W-box и WUN-motif), свет (ATCT-motif, box4 и GT1-motif) и салициловую кислоту (SARE), а также участвующих в связывании с транскрипционными факторами семейства MYB (MYB-like) (рис. 6,б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Окраска плодов растений в красно-сине-фиолетовой гамме, привлекающая опылителей и распространителей семян, обусловлена синтезом и накоплением антоцианов в вакуолях клеток [18]. Помимо аттрактивной функции, антоцианы являются антиоксидантами и участвуют в ответных реакциях на абиотические и биотические стрессы [18, 19]. Критическую роль в определении антоциановой окраски плодов играют антоцианидин-3-О-глюкозилтрансферазы [10, 11, 16]. Под действием этих ферментов к молекулам антоцианидинов в 3-О-положении присоединяются молекулы сахара, в результате чего образуются стабильные водорастворимые пигменты, которые затем транспортируются в вакуоли [8, 9].

Ранее в геноме перца *C. annuum* (сорта Zunla-1) были аннотированы три гена антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз (*Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*), tandemно расположенные на хромосоме 10. Проведенный нами анализ референсного генома перца *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1B) выявил два гена антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз, соответствующие *Capana10g001978* и *Capana10g001980* и названные в данной работе *UFGT1* и *UFGT2* (табл. 3), а также

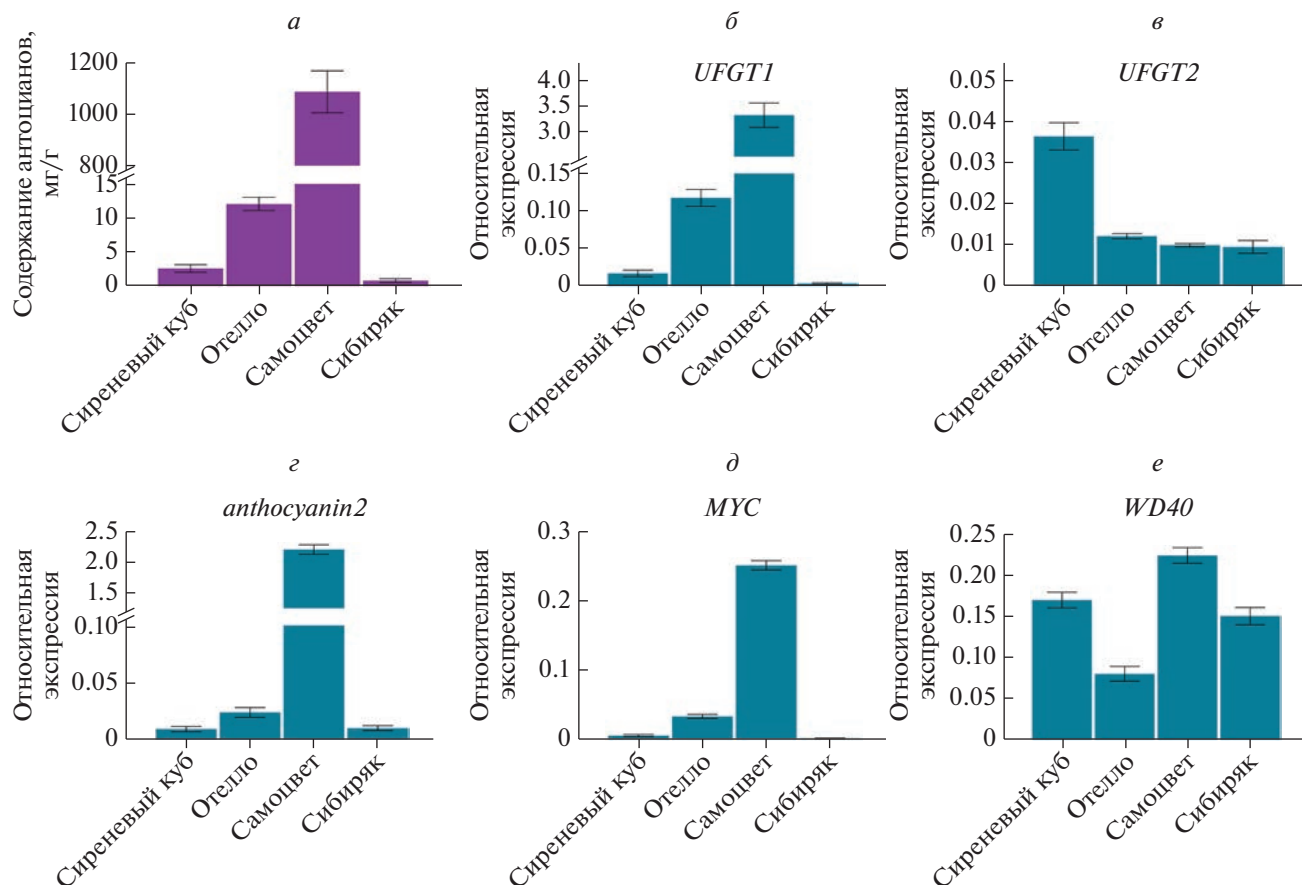


Рис. 4. Содержание антоцианов (а) и экспрессия генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (б) и *UFGT2* (в) и генов транскрипционных факторов *anthocyanin2* (г), *MYC* (д) и *WD40* (е) в листьях сортов перца Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк.

третью последовательность (*Capana10g001979*), которая не аннотирована, видимо, из-за присутствия преждевременного стоп-кодона.

Ранее было выдвинуто предположение, что *Capana10g001979*, в отличие от своих безинтронных паралогов, содержит интрон, куда попадает преждевременный стоп-кодон, и эта область вырезается в процессе сплайсинга. Однако праймеры, использованные авторами этой работы для экспрессионного анализа *Capana10g001979* и *Capana10g001980* [15], не позволяют дифференцировать данные транскрипты. Более того, РВ-ПЦР с праймерами (табл. 2), разработанными нами с учетом предсказаний J. Liu с соавт. (2020), не детектировала транскриптов *Capana10g001979* ни в листьях, ни в плодах образцов перца, независимо от окраски тканей. С учетом 99% идентичности *Capana10g001979* и *Capana10g001980*, экспрессионные данные позволяют считать *Capana10g001979* псевдогеном, появившимся в результате недавней дупликации *Capana10g001980*.

В отличие от перца, другие представители пасленовых содержат в геноме только один паралог

UFGT1 (рис. 1), который является ближайшим гомологом *Capana10g001978* [15] и соответствует ранее описанному гену *CaUFGT* (FJ705848) [5]. Можно предположить, что именно данный ген является основным из трех паралогичных генов в биосинтезе антоцианов в тканях перца. Чтобы оценить данную гипотезу, нами был проведен сравнительный анализ экспрессии генов *UFGT1* и *UFGT2* в листьях и кожце плодов образцов перца с разным паттерном окраски тканей (рис. 2, табл. 1) в сочетании с биохимическим определением содержания суммы антоцианов (рис. 3, 4). Анализ возможных корреляций показал, что количество суммы антоцианов прямо зависит от уровня экспрессии гена *UFGT1* как в кожце плода, так и в листьях перца, и не связано с экспрессией *UFGT2* (рис. 5).

Ранее сообщалось, что в кодирующей последовательности гена *UFGT1* (*Capana10g001978*) содержатся приводящие к аминокислотным замещениям нуклеотидные замены C528A и A708G, коррелирующие с наличием антоцианов в кожце незрелого плода у образцов перца *C. annuum*

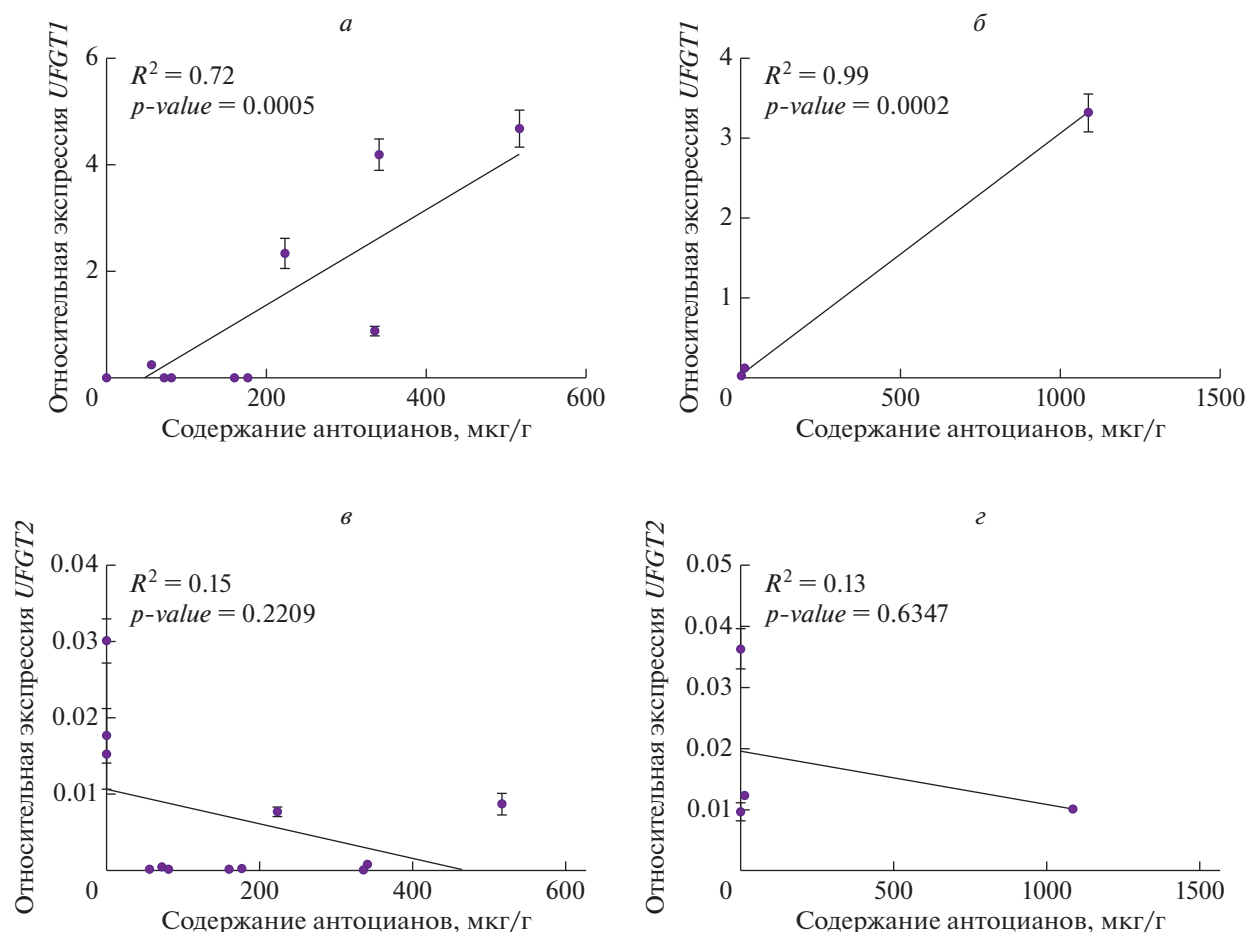


Рис. 5. Линейная регрессия экспрессии генов *UFGT1* и *UFGT2* и содержания антоцианов в кожице плодов (а, в) и листьях (б, г).

[15]. Поэтому, представлялось интересным изучить полиморфизм гена *UFGT1* у российских сортов перца. Анализ кДНК *UFGT1* в геноме 18 сортов перца с различной окраской листьев и плода в процессе созревания (табл. 1) выявил полную идентичность последовательности между образцами. В положениях 528 и 708 последовательности гена *UFGT1* у всех анализируемых сортов перца находились аденин (А) и гуанин (G), характерные, по данным [15], только для фиолетовой окраски незрелого плода.

В промоторной области гена *UFGT1* в работе J. Liu с соавт. (2020) также были выявлены SNPs и индели, ассоциированные с наличием антоциановой окраски незрелого плода. Проведенный нами анализ промоторов *UFGT1* (1000 пн) у 18 российских сортов перца с различной окраской незрелого плода показал инвариантность последовательности среди образцов и ее идентичность последовательности в референсном геноме (сорт UCD-10X-F1). При этом индель AAATACTAT-CATAAGTGACATATT (в положении –437), характерная для образцов перца с фиолетовой окраской

плода [15], присутствовала в промоторных областях гена *UFGT1* всех анализируемых нами сортов перца. Другие индели в положениях –738, –146 и –33 [15] у анализируемых нами сортов перца обнаружены не были.

Таким образом, заключение о присутствии полиморфных вариантов, ассоциированных с антоциановой окраской плода, выдвинутое J. Liu с соавт. (2020), можно считать необоснованными. Отсутствие таких вариантов позволяет предположить наличие других факторов, определяющих уровень экспрессии гена. Обнаруженные в промоторной области генов *UFGT1* и *UFGT2* *cis*-регуляторные элементы, вовлеченные в ответ на различные стрессы, в том числе свет (рис. 6, б), подтверждают известные данные об участии антоцианов в регуляции стрессоустойчивости. Например в ответ на заражение *Penicillium digitatum* в плодах апельсина (*Citrus sinensis*) наблюдается активация биосинтеза антоцианов, а экспрессия структурных генов флавоноидного пути, в том числе *UFGT*, возрастает в 2–10 раз [20]. В листьях винограда (*Vitis vinifera*) засуха и вирусная инфекция приводят

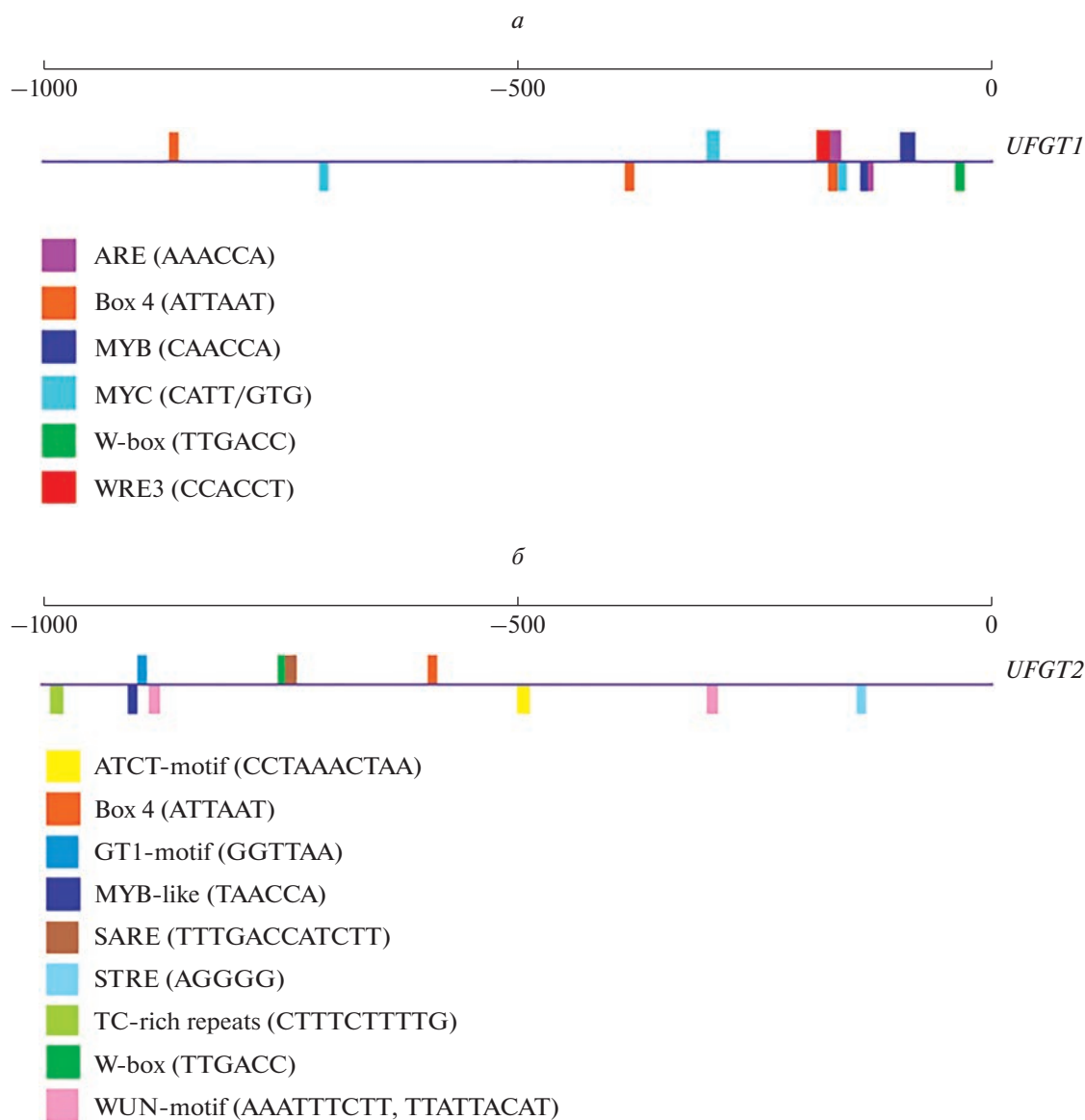


Рис. 6. Предсказанные *cis*-регуляторные элементы в промоторной области (1000 пн) генов *UFGT1* (а) и *UFGT2* (б).

к активации транскрипции структурных генов флавоноидного пути, а также фактора транскрипции семейства R2R3-MYB *VvMYBA1* [19, 21].

При отсутствии различий в промоторе *UFGT1* между образцами уровень экспрессии гена, скорее всего, регулируется комплексом MBW [9, 11, 12, 14]. Действительно, анализ *cis*-регуляторных элементов идентифицировал сайты связывания с транскрипционными факторами семейства MYB в промоторе как *UFGT1*, так и *UFGT2* (рис. 6). При этом анализ экспрессии генов *anthocyanin2* (R2R3-MYB), *MYC* (bHLH) и *WD40* (WD-repeat), продукты которых составляют комплекс MBW, показал, что уровень экспрессии двух из них прямо коррелирует с экспрессией *UFGT1*, но не *UFGT2* (рис. 4).

Интересно, что уровень транскрипции гена *UFGT2* не имел никакой ассоциации с содержанием антоцианов (рис. 3–5). Так, самые высокие уровни транскрипции среди образцов наблюдались в кожце плодов сорта Сибиряк, не содержащей антоцианов (рис. 3,а, в), а также в листьях сорта Сиреневый куб, которые имеют зеленую окраску и накапливают низкое количество антоцианов (рис. 4,а, в). При этом промоторная область гена *UFGT2* в сравнении с *UFGT1* была более обогащена стресс- и гормон-чувствительными *cis*-регуляторными элементами (STRE, TC-rich repeats, W-box, WUN-motif, SARE) (рис. 6,б). Можно предположить, что функция гена связана скорее с ответом растения перца на различные абиотические и

биотические стрессы, чем с биосинтезом антоцианов.

Таким образом, можно предположить, что в растениях перца уровень синтеза антоцианов и в листьях, и в плоде находится в прямой зависимости от активности одного из трех генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансферазы – гена *UFGT1*, регуляция которой зависит от активности членов комплекса MBW. При этом не имеется никаких полиморфных вариантов в самом гене, ассоциированных с различиями в уровне биосинтеза антоцианов и, как следствие, окраской плода. Гены *UFGT2* и *Capana10g001979* появились, вероятно, в результате тандемной трипликации гена *UFGT1* в геноме перца при возникновении и диверсификации видов *Capsicum*. Ген *Capana10g001979* является псевдогеном, тогда как ген *UFGT2* может проявлять тенденцию к неофункционализации, вероятно, связанной с ответом растения на стрессы, но не с биосинтезом антоцианов (исходя из данных его высокой экспрессии в коже плода сорта Сибиряк в сочетании с полным отсутствием там антоцианов).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 19-16-00016) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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. Mateos R.M., Jiménez A., Román P. et al. Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): Involvement in the response to temperature changes in ripe fruits // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 9556–9580 <https://doi.org/10.3390/ijms14059556>
2. Moscone E.A., Scaldaferrro M.A., Grabielle M. et al. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): A cytogenetic perspective // Acta Hort. 2007. V. 745. P. 137–170. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.5>
3. García C.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>
4. Borovsky Y., Oren-Shamir M., Ovardia R. et al. The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to *Anthocyanin2* of *Petunia* // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 23–29. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1625-9>
5. Aza-González C., Herrera-Isidró L., Núñez-Palenius H.G. et al. Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development // Biol. Plant. 2013. V. 57. P. 49–55. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0265-1>
6. 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. С. 644–653. <https://doi.org/10.31857/S0015330320050048>
7. Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids // Plant J. 2008. V. 54. P. 733–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
8. Ma Y., Ma X., Gao X. et al. Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222011116>
9. Naing A.H., Kim C.K. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // Plant Mol. Biol. 2018. V. 98. P. 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4>
10. Zhao Z.C., Hu G.B., Hu F.C. et al. The UDP glucose: Flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene regulates anthocyanin biosynthesis in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) during fruit coloration // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 6. P. 6409–6415.
11. Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E. et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review // Front. Chem. 2018. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
12. Villa-Rivera M.G., Ochoa-Alejo N. Transcriptional regulation of ripening in chili pepper fruits (*Capsicum* spp.) // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222212151>
13. 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. С. 1161–1170. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090064>
14. Wang Y., Liu S., Wang H. et al. Identification of the regulatory genes of UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in pepper fruit // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23041960>
15. Liu J., Ai X., Wang Y. et al. Fine mapping of the *Ca3GT* gene controlling anthocyanin biosynthesis in mature unripe fruit of *Capsicum annuum* L. // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133(9). P. 2729–2742. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03628-7>
16. Kobayashi S., Yamamoto N.G., Hirochika H. Association of *VmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin – color mutants // J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 2005. V. 74. P. 196–203.
17. 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.

18. Cappellini F., Marinelli A., Toccaceli M. et al. Anthocyanins: From mechanisms of regulation in plants to health benefits in foods // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748049>
19. Cui Z.H., Bi W.L., Hao X.Y. et al. Drought stress enhances up-regulation of anthocyanin biosynthesis in grapevine leafroll-associated virus 3-infected *in vitro* grapevine (*Vitis vinifera*) leaves // *Plant Dis.* 2017. V. 101(9). P. 1606–1615. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0104-RE>
20. Sicilia A., Catara V., Scialò E., Lo Piero A.R. Fungal infection induces anthocyanin biosynthesis and changes in DNA methylation configuration of blood orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] // *Plants (Basel)*. 2021. V. 10(2). <https://doi.org/10.3390/plants10020244>
21. Gutha L.R., Casassa L.F., Harbertson J.F., Naidu R.A. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves // *BMC Plant Biol.* 2010. V. 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-187>

Anthocyanidin-3-O-Glucosyltransferase Genes in Pepper (*Capsicum* spp.) and Their Role in Anthocyanine Biosynthesis

M. A. Filyushin^a *, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^aFederal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

In pepper (*Capsicum* spp.), anthocyanins are important not only for the photolabile compounds protection, but also for the regulation of fruit color pattern. Anthocyanidin-3-O-glucosyltransferases (UGTs) play a key role in the biosynthesis of stable anthocyanins. In this work, the structure and phylogeny of three pepper *UGT* homologue genes are characterized. Biochemical analysis of *C. annuum* cultivars (cv. Syrenevii cube, Othello and Sibiryak) and *C. frutescens* (cv. Samotsvet), which differ in the pattern of fruit pigmentation during ripening, showed the presence of anthocyanins in leaves and fruit peel of all accessions (except for the cv. Sibiryak fruit). The highest anthocyanins content was found in the purple leaves of the cv. Samotsvet. In the fruit peel of all accessions, the anthocyanins content decreased with ripening. Expression analysis of the same tissues showed that *UGT1* (LOC107843659) and *UGT2* (LOC107843660) transcripts are present in the leaves of all cultivars. In the fruit peel, *UGT1* transcripts were detected at maturation stages 1 (cv. Syrenevii cube and Othello) and 1–3 (cv. Samotsvet), while *UGT2* transcripts were found in all accessions with the maximum in the cv. Sibiryak, where anthocyanins were absent. Transcripts of the MBW complex (*anthocyanin2*, *MYC*, and *WD40*), which regulates the biosynthesis of anthocyanins, were present in the leaves of all cultivars with a maximum in the purple leaves of the cv. Samotsvet. Comparison of biochemical and expression data revealed a positive correlation between the amount of anthocyanins in fruit peel and leaves and *UGT1* expression level. For *UGT2* such correlation was not found. Analysis of *UGT1* sequence, including the promoter region, in 18 pepper cultivars that differ in fruit color pattern, revealed sequence invariance, regardless of the color of the immature fruit. Analysis of the *UGT1* and *UGT2* promoter sequences showed differences in the composition of *cis*-regulatory elements involved in response to stress and hormones, and in MYB and MYC transcription factors binding sites.

Keywords: *Capsicum* spp., pepper cultivars, anthocyanins biosynthesis, anthocyanidin-3-O-glucosyltransferase, UGT, the content of anthocyanins, gene expression.