

## ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ АНТОЦИАНОВ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ И СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ У ВИДОВ ПЕРЦА *Capsicum L.*

© 2023 г. М. А. Филюшин<sup>1</sup>\*, А. В. Щенникова<sup>1</sup>, Е. З. Кочиева<sup>1</sup>

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

\*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 26.04.2023 г.

В данной работе охарактеризованы содержание антоцианов и профиль экспрессии регуляторных (*CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*) и структурных (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUFGT1* и *CaGSTF12*) генов пути биосинтеза антоцианов в листьях, лепестках цветка и кожице незрелого плода сортов перца *Capsicum frutescens L.* (Самоцвет, Рождественский букет и Эврика), различающихся паттерном антоциан-опосредованной пигментации надземных органов. Выявлена положительная корреляция уровня транскриптов *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS* и *CaCSTF12* с количеством антоцианов в листьях данных сортов. Показано, что из трех регуляторных генов экспрессируется только *CaMYB113*. На примере десяти сортов трех видов перца *Capsicum* подтверждено присутствие 5'-UTR в мРНК *CaMYB113*. В геноме сортов Рождественский букет и Самоцвет с фиолетовой окраской анализируемых органов выявлен второй вариант аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией ретротранспозона *LINE-1* в интроне I.

**Ключевые слова:** *Capsicum* spp., сорта перца, биосинтез антоцианов, MYB113, содержание антоцианов, экспрессия гена.

**DOI:** 10.31857/S0016675823090047, **EDN:** WUBUUN

Род *Capsicum* (Solanaceae) объединяет около 35 видов перца, из которых культивируются только пять — *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* и *C. pubescens* [1, 2]. Плоды перца являются важной составляющей диеты человека, поскольку они богаты питательными веществами, а также антиоксидантами — аскорбатом, каротиноидами и флавоноидами [3]. Каротиноиды и относящиеся к флавоноидам антоцианы в совокупности с хлорофиллами определяют окраску плодов перца [4, 5]. Незрелые плоды имеют зеленую или фиолетовую окраску благодаря присутствию разных соотношений хлорофиллов и антоцианов. По мере созревания плода окраска становится красной, желтой или оранжевой за счет усиления синтеза и накопления каротиноидов. При этом каротиноиды запасаются благодаря формированию на данной стадии хромопластов и секвистрирующих структур внутри них, тогда как антоцианы накапливаются в вакуолях и могут влиять на пигментацию не только плодов, но также корней, листьев, стеблей и цветковых органов.

У видов *Capsicum* антоциан-ассоциированная окраска определяется присутствием производ-

ных дельфинидина, придающих тканям сине-фиолетовые оттенки [6]. Такая окраска характерна для гипокоты и, реже, кожицы незрелого плода. Некоторые генотипы отличаются фиолетовой окраской всех надземных органов (листьев, стеблей, цветков и плодов). Ряд образцов *C. chinense* сохраняет фиолетовую окраску плода на всех стадиях его созревания, включая спелость [7].

Путь биосинтеза антоцианов у растений высоко консервативен и является ветвью флавоноидного пути. Дельфинидин, равно как и другие два антоцианидина (пеларгонидин и цианидин), образуются в результате последовательных реакций, катализируемых халконсинтазой (CHS), халконизомеразой (CHI), флаванон-3-гидроксилазой (F3H), флавоноид-3'-гидроксилазой (F3'H), флавоноид-3'5'-гидроксилазой (F3'5'H), дигидрофлавонол-4-редуктазой (DFR) и антоцианидинсинтазой (ANS). Антоцианидины затем гликозилируются с помощью UDP-глюкозофлавоноид-3-О-глюкозилтрансферазы (UFGT) с получением стабильных и водорастворимых пигментов [8, 9]. Транспорт антоцианов из цитозоля в вакуоль осуществляется

специфической глутатион-S-трансферазой класса phi (GSTF12) [10].

Профиль экспрессии структурных генов пути биосинтеза антоцианов координируется MBW-комплексом, состоящим из транскрипционных факторов (ТФ) семейств R2R3-MYB, bHLH и WD-repeat [8, 11]. Различия в составе MBW-комплекса определяют пространственно-временную регуляцию синтеза флавоноидов [12].

Согласно результатам генетических исследований, у видов *Capsicum* биосинтез антоцианов регулируется локусом *A*, картированным на хромосоме 10 [13, 14]. В данном локусе идентифицирован ген транскрипционного фактора (ТФ) семейства R2R3-MYB, ортогольный гену *anthocyanin2* петунии *Petunia* × *hybrida* Hort. ex E. Vilm., 1863 [4]. Позднее секвенирование геномов *C. annuum* показало, что локус *A* содержит не один, а три гена, кодирующих ТФ семейства R2R3-MYB: *MYB113* (LOC107844888; синонимы *CaMYBA*, *anthocyanin2* (*AN2*)), *MYB1* (LOC107854818; синоним *CaMYBB*) и *MYB1-like* (LOC107844901; синоним *CaPHZ*). В геноме других видов Solanaceae идентифицировано три (картофель *Solanum tuberosum* L. (*StAN1*, *StMYBA1* и *StAN2/MYB113*), баклажан *Solanum melongena* L. (*SmMYB1*, *SmMYB2* и *SmMYB75*)) и четыре (*P. × hybrida* (*PhAN2*, *PhAN4*, *PhPHZ* и *PhDPL*), томат *Solanum lycopersicum* L. (*SIANT1*, *SIAN2*, *SIMYB75* и *SIMYB113*)) гена ТФ R2R3-MYB, связанных с регуляцией биосинтеза антоцианов [16–19]. У томата и картофеля данные гены, как и у перца, расположены тандемно на хромосоме 10, тогда как у петунии и баклажана их хромосомная локализация неизвестна в связи с отсутствием финальной сборки генома по хромосомам.

Дальнейшие исследования показали, что из трех R2R3-MYB генов перца, которые связывают с регуляцией биосинтеза антоцианов, только один – *CaMYB113* (*CaMYBA*) экспрессируется в цветках и плодах фиолетовой окраски [20]. Рост уровня транскриптов данного гена сопровождается увеличением содержания дельфинидина в плоде [21]. Более того, наличие транскрипционной активности гена критично для пигментации ткани и связано с инсерцией ретротранспозона *LINE-1* в интроне I *CaMYB113* в геноме сортов, формирующих фиолетовые плоды и цветковые лепестки [20]. До недавнего времени данный интрон считался частью промотора [22]. Анализ структуры гена без интрона I у сортов *C. chinense* с различной окраской плода обнаружил высокий уровень сходства гомологов. Кроме того, показана положительная зависимость экспрессии *CcDFR* и *CcUFGT* и содержания антоцианов в кожице плода от уровня транскриптов *CcMYB113* [7].

В настоящей работе последовательности гена *CaMYB113* были идентифицированы и охарактеризованы у десяти сортов перца трех видов (*C. an-*

*nuum*, *C. frutescens* и *C. chinense*), различающихся окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода. У трех сортов *C. frutescens* были определены содержание антоцианов и профиль экспрессии регуляторных и структурных генов пути биосинтеза антоцианов в надземных органах растений, на основе чего была проведена оценка возможных корреляционных связей между полученными данными.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали сорта перца *C. annuum* (Сибиряк, Гранат, Желтый букет, Сиреневый куб, Отелло и Янтарь), *C. frutescens* (Самоцвет, Рождественский букет и Эврика) и *C. chinense* (Pimenta da Neyde) (табл. 1). Семена были любезно предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (Московская обл.). Выбранные сорта различались окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода (табл. 1). Сорта Сибиряк, Гранат и Желтый букет отличались от других сортов отсутствием фиолетовой окраски данных тканей. Для сортов Сиреневый куб, Отелло, Янтарь и Эврика была характерна фиолетовая окраска кожицы незрелого плода. У сортов Самоцвет и Рождественский букет все надземные органы имели фиолетовую пигментацию, которая у спелых плодов менялась на красную. Сорт Pimenta da Neyde также формировал фиолетово-окрашенные листья, лепестки и плоды, однако плоды сорта сохраняли данную пигментацию до стадии биологической спелости.

Растения выращивали в экспериментальной установке искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м<sup>2</sup>/с)). Геномную ДНК выделяли из 10-дневных проростков с помощью СТАВ-буфера [23]. Последовательности *CaMYB113* амплифицировали с помощью разработанных праймеров (табл. 2) и секвенировали на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Выравнивание и структурно-филогенетический анализ последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.26 (<https://www.megasoftware.net/>). Для построения дендрограммы использовали последовательности анализируемых белков и их ортологов из других видов Пасленовых (томат, картофель, баклажан) и *Arabidopsis thaliana* L. (метод Neighbor-Joining, 1000 бутстреп-реплик). Консервативные домены и мотивы в белках определяли с помощью NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), MEME5.1.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) и литературных данных.

Биохимический и экспрессионный анализы проводили с использованием сортов Эврика,

**Таблица 1.** Наличие/отсутствие (+/–) фиолетовой окраски органов у анализируемых сортов перца

Вид	Сорт	Листья	Лепестки цветка	Кожица незрелых плодов
<i>C. annuum</i>	Сибиряк	–	–	–
	Гранат	–	–	–
	Желтый букет	–	–	–
	Сиреневый куб	–	–	+
	Отелло	–	–	+
	Янтарь	–	–	+
<i>C. frutescens</i>	Самоцвет	+	+	+
	Рождественский букет	+	+	+
	Эврика	–	–	+
<i>C. chinense</i>	Pimenta da Neyde	+	+*	+

\* – только нижняя сторона лепестков имеет светло-фиолетовую окраску.

**Таблица 2.** Последовательности праймеров, использованные в данной работе

Ген	Праймер	Последовательность (5' → 3')	Применение	Ожидаемый размер ампликона, пн
<i>CaMYB113</i>	an2-F	TTAAAAGTAAGACGAAGGGAT	Аmplификация и секвенирование гена	1600
	an2-R	TACTTGGGATAGTACGAAC		
	L1-F	GGTGGCAGAAATGCGGATG	Детекция ретротранспозона <i>LINE-1</i>	1020/5300 (при наличии вставки <i>LINE-1</i> )
	an2-prF	GGAAGGAGGCTAGTCAAATC	Аmplификация и секвенирование 5'-UTR гена	131
	an2-R2	AACATGAACTTGCCTGTTGC		
	<i>CaMYB1</i>	MYB113-rtF	GCAGAAAGAGCTGTAGATTGAG	РВ-ПЦР
MYB113-rtR		TCTCTTGTCGATGAGGAGCAG		
<i>CaMYB1-like</i>	MYB1-rtF	GTCGGAAGAGCTGCAGACTTC	145	150
	MYB1-rtR	CTTCCCGGAAGTCTACCAGCA		
<i>CaMYC</i>	MYB1-like-rtF	GAGGTGACTTTCGATCCAGACG	215	194
	MYB1-like-rtR	CCTCAGAAGGTGAGTGTTCCAA		
<i>CaCHS</i>	CaMYC-rtF	CAATGGGGCTATAAAGACTAGGAA	194	151
	CaMYC-rtR	GGAAAAGAGAAAAGAAACACACATG		
<i>CaCHI</i>	CaCHS-rtF	CTGTGTTGATCAAGCCACCTATC	119	152
	CaCHS-rtR	CTAGCATCAAGAGAAGGAGCCA		
<i>CaF3H</i>	CaCHI-rtF	TTACTCAATCACCGGCTGGG	142	123
	CaCHI-rtR	CTTTGCGGCAGGTGAAACTC		
<i>CaDFR</i>	CaF3H-rtF	GGATCACGGTTAAGCCCATTG	181	
	CaF3H-rtR	TGCTATTTCGAGTTCACCACTGC		
<i>CaANS</i>	CaDFR-rtF	GCTGGATTATCGGCTCTTGG	142	
	CaDFR-rtR	GTCTGCTTTCCACAGCGTTAAG		
<i>CaUFGT1</i>	CaANS-rtF	CAAATGCCCACAACCAGAACTAGC	123	
	CaANS-rtR	CGCACTTTGCAGTTACCCACTTTC		
<i>CaGSTF12</i>	CaUFGT1-rtF	CAATGAAAGAGGCAGAGGAGGA	181	
	CaUFGT1-rtR	GCAGTCCAAAATGCAATCCAAGG		
	CaGSTF12-rtF	GGTATACAACATGGTACTCCAAC		
	CaGSTF12-rtR	GGAGGTGGCTTAGATCAGC		



**Рис. 1.** Внешний вид листьев, цветков и плодов (незрелого (1) и биологической спелости (2)) сортов перца Эврика, Рождественский букет и Самоцвет.

Рождественский букет и Самоцвет. Растения выращивали до стадии плодоношения и собирали листья, лепестки цветка и кожицу незрелых плодов (рис. 1). Собранные ткани растирали в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) с последующей очисткой от примесей геномной ДНК (RNase free DNasy set, QIAGEN, Германия). Полученные препараты РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Содержание суммы антоцианов (в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид) определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, в двух биологических и трех технических повторах, согласно методике [24].

Профиль экспрессии анализируемых генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Относительный уровень экспрессии генов оценивали, нормализуя его по референсным генам *GAPDH* (LOC107862704) и *UBI* (LOC107873556). РВ-ПЦР проводили с использованием разработанных праймеров (табл. 2), 3 нг кДНК-матрицы, набора “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и амплификатора CFX96 Real-Time

PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции выполняли 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

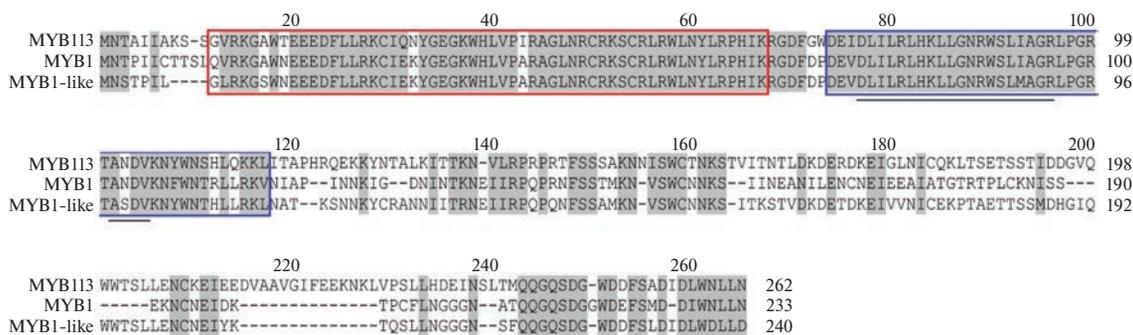
### РЕЗУЛЬТАТЫ

*Характеристика генов CaMYB113, CaMYB1 и CaMYB1-like.* Из локуса *A* генома перца сорта UCD-10X-F1 (GCF\_002878395.1) были извлечены последовательности трех генов, *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*, кодирующих высокоомологичные (идентичность 56–68%) ТФ семейства R2R3-MYB (табл. 3). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like* показал, что все они содержат характерные для семейства R2R3-MYB домены (R2 (56 ак) и R3 (43 ак)) и консервативные мотивы ([D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R и ANDV (кроме *CaMYB1-like*)) (рис. 2).

Проведенный филогенетический анализ белковых последовательностей *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like* и их ортологов из других видов *So-*

**Таблица 3.** Характеристика генов ТФ R2R3-MYB, расположенных в локусе *A* генома перца *S. annuum* (сорт UCD-10X-F1, сборка GCF\_002878395.1)

Ген (синонимы)	Ген ID	Локализация в геноме	Длина, пн	CDS, пн	Белок, ао	MW, кДа
<i>CaMYB113</i> ( <i>CaMYBA</i> , <i>anthocyanin2</i> )	LOC107844888	chr10: 173281194–173282672	1479	789	262	30.2
<i>CaMYB1</i> ( <i>CaMYBB</i> )	LOC107854818	chr10: 175096270–175097356	1086	702	233	26.7
<i>CaMYB1-like</i> ( <i>CaPHZ</i> )	LOC107844901	chr10: 175943586–175945054	1468	723	240	27.8



**Рис. 2.** Выравнивание аминокислотных последовательностей MYB113, MYB1 и MYB1-like *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1). Красной рамкой выделен домен R2, синей рамкой – домен R3. Консервативные мотивы [D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R и ANDV подчеркнуты черным.

lapaseae и модельного вида *A. thaliana* разделит ТФ на три клады. Белки *A. thaliana* сгруппировались отдельно (клада III), тогда как белки Пасленовых распределились по кладам I и II, каждая из которых в свою очередь делилась на два кластера. CaMYB113 попал в кластер I(1) вместе с MYB113 томата и картофеля и MYB2 баклажана. Структурно близкие друг другу белки CaMYB1 и CaMYB1-like были отнесены в кластер II(4) вместе с AN1 картофеля. Кластер II(3) содержал более отдаленные гомологи MYB1 из томата и баклажана. Таким образом, на дендрограмме белки CaMYB113, CaMYB1 и CaMYB1-like сгруппировались с соответствующими ортологами других видов Solanaceae (рис. 3,а).

Анализ консервативных мотивов в анализируемых белковых последовательностях выявил различия между кластерами MYB113 I(1), MYB75 I(2) и MYB1 II (рис. 3,а, б). Мотивы 8, 10, 12 и 13 отличали белки *A. thaliana* от их ортологов у Пасленовых, тогда как мотивы 2, 3, 5, 6, 7, 9 и 14 присутствовали только у ТФ Пасленовых. Среди последних мотив 14 (консенсус IQENKYNNAL) был специфичен только для белков кластера MYB113 I(1). Гомологи MYB1 клады II различались, главным образом, отсутствием (кластер 3)/наличием (кластер 4) мотива 7 (рис. 3,б).

Согласно последней версии сборки генома перца *C. annuum* сорта UCD-10X-F1 (NCBI:GCF\_002878395.1), ген *CaMYB113* (NM\_001324618.1, LOC107844888) состоит из четырех экзонов и трех интронов. Первый экзон и начало второго экзона относятся к нетранслируемой области гена, и интрон между ними различается между генотипами перца протяженным инделем (~4.3 тпн) ретротранспозона *LINE-1* (рис. 4,б), который предположительно участвует в активации экспрессии *CaMYB113* [20].

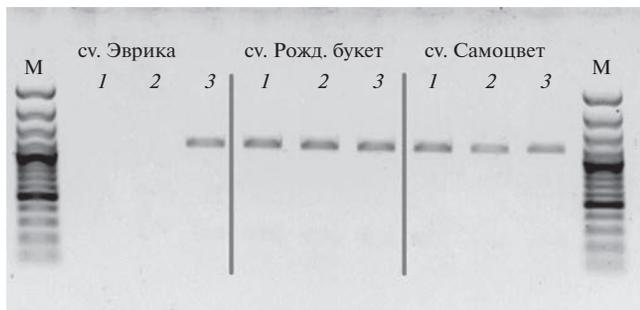
Для подтверждения наличия 5'-UTR в структуре мРНК *CaMYB113* (LOC107844888) (рис. 4,а) предполагаемая полная последовательность

мРНК была амплифицирована с помощью праймеров an2-prF/an2-R (рис. 4,б; табл. 2) на кДНК из листьев, лепестков цветка и фиолетово-окрашенной кожицы незрелого плода сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (*C. frutescens*). Фрагменты ожидаемой длины (~1100 пн) были получены для всех анализируемых образцов, за исключением листьев и лепестков сорта Эврика (рис. 5), что согласуется с различиями в окраске листьев и лепестков (фиолетовые vs. зеленые/белые) у анализируемых сортов (рис. 1). В результате секвенирования и структурного анализа ампликонов было подтверждено, что мРНК *CaMYB113* состоит из четырех экзонов и полностью соответствует референсу (LOC107844888) (рис. 4,а).

Для определения варибельности последовательности *CaMYB113* и возможного присутствия в первом интроне ретротранспозона *LINE-1* [20] был проведен анализ структуры гена у 10 сортов перца, семь из которых формируют незрелые плоды с кожицей фиолетовой окраски (табл. 1). Для этого на геномной ДНК образцов с помощью разработанных праймеров (табл. 2, рис. 4) были амплифицированы и секвенированы два участка последовательности гена *CaMYB113*: “экзон 2–экзон 4” (праймеры an2-F и an2-R) (рис. 6,а) и “экзон 1–экзон 2” (an2-prF и an2-R2) (рис. 6,б). Размер ампликонов был одинаков для всех анализируемых сортов перца как в случае фрагмента an2-F/an2-R, так и в варианте an2-prF/an2-R2.

Сравнительный анализ кодирующих последовательностей *CaMYB113* (на основе полученных ампликонов an2-F/an2-R) анализируемых сортов с референсом (сорт UCD-10X-F1) выявил 5 SNPs: g36→с (Pimenta da Neyde), a1064→g (Сибиряк, Отелло, Янтарь, Эврика, Pimenta da Neyde), a1073→g (Pimenta da Neyde), c1094→a (Сибиряк, Отелло, Янтарь, Эврика, Pimenta da Neyde) и a1284→t (Pimenta da Neyde). Три полиморфизма (a1064→g, c1094→a и a1284→t) оказались несинонимичными и приводили к замещениям ами-

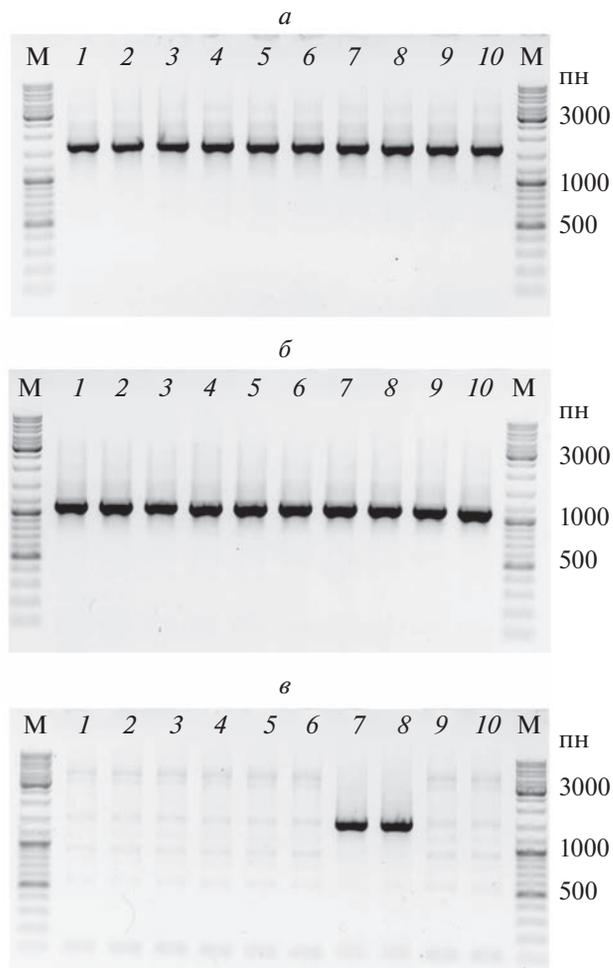




**Рис. 5.** Электрофоретическое разделение в 1.5%-агарозном геле ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью пары праймеров an2-prF/an2-R на препаратах кДНК из листьев (1), лепестков цветка (2) и кожицы незрелого плода (3) сортов (cv.) Эврика, Рождественский (Рожд.) букет и Самоцвет. М – маркер длин GeneRuler DNA Ladder Plus 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

праймерами L1-F и an2-R2 (табл. 2; рис. 4,б). В результате данный вариант аллеля (*CaMYB113-L1*) был идентифицирован у сортов Самоцвет и Рождественский букет (рис. 6,в), что подтверждено секвенированием и сравнением ампликонов с референсом; последовательности, идентичные у анализируемых сортов, отличались от последовательности сорта Peruvian purple (LC473089.1) семью SNPs. Мы пытались амплифицировать у сортов Самоцвет и Рождественский букет с помощью праймеров an2-prF/an2-R полногеномную последовательность аллеля *CaMYB113-L1* и отдельно первый интрон, содержащий вставку ретротранспозона (праймеры an2-prF/an2-R2), однако по непонятной причине нам не удалось амплифицировать этот аллель. Поэтому о наличии аллеля *CaMYB113-L1* у сортов Самоцвет и Рождественский букет мы судим по фрагменту (амплифицированному с помощью праймеров L1-F и an2-R2), содержащему 3'-конец ретротранспозона *LINE-1*, интрон 1 и экзон 2.

Таким образом, можно предположить, что геном сортов Самоцвет и Рождественский букет содержит два аллеля гена *CaMYB113* – со вставкой ретротранспозона *LINE-1* (*CaMYB113-L1*) и без нее (*CaMYB113*). Нам не удалось амплифицировать у данных сортов фрагмент аллеля *CaMYB113-L1* “экзон 1–экзон 2” (an2-prF/an2-R2), который включал бы полную последовательность (4.3 тпн) *LINE-1*, что может объясняться предпочтительной амплификацией значительно более короткого соответствующего фрагмента аллеля *CaMYB113*. Полученные данные согласуются с различиями в окраске листьев (фиолетовая vs. зеленая) анализируемых сортов перца (табл. 1), за исключением сорта Pimenta da Neyde (*C. chinense*). Все анализируемые органы данного образца, подобно сортам Самоцвет и Рождественский букет, имеют фиолетовую окраску, однако фрагмент L1-F/an2-R2 на



**Рис. 6.** Разделение в 1.5%-агарозном геле ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью пар праймеров an2-F/an2-R (а), an2-prF/an2-R2 (б) и L1-F/an2-R2 (в) на препаратах геномной ДНК проростков анализируемых сортов перца: 1 – Сибиряк, 2 – Гранат, 3 – Желтый букет, 4 – Сиреневый куб, 5 – Отелло, 6 – Январь, 7 – Самоцвет, 8 – Рождественский букет, 9 – Эврика, 10 – Pimenta da Neyde.

геномной ДНК сорта Pimenta da Neyde не амплифицировался (рис. 6,в). Это может быть связано с генотип-специфичными полиморфизмами в последовательности *LINE-1*, которые могли повлиять на отжиг праймера L1-F.

**Содержание антоцианов. Профили экспрессии генов ТФ семейств R2R3-MYB и bHLH, ферментов пути биосинтеза антоцианов, а также транспортера антоцианидинов.** С целью оценки зависимости накопления антоцианов от активности генов пути их биосинтеза в листьях, лепестках цветка и кожице незрелого плода сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет была определена сумма антоцианов и профили экспрессии генов ТФ (*CaMYB113*, *CaMYB1*, *CaMYB1-like* и *CaMYC*), ферментов (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*,

CaANS, CaUFGT1) флавоноидного пути и транспортера антоцианидинов (CaGSTF12).

В результате у сорта Эврика антоцианы были выявлены только в кожице плода (~68 мкг/г), тогда как у сортов Рождественский букет и Самоцвет – во всех анализируемых органах с максимумом в кожице плода (~274 мкг/г) (Рождественский букет) и в листьях (~845 мкг/г) (Самоцвет) (рис. 7,а). В кожице плода сорта Рождественский букет содержание антоцианов было в 3 и 5.4 раза выше, чем в листьях и лепестках, тогда как у сорта Самоцвет количество антоцианов в листьях превышало в 18 и 15 раз таковое в лепестках и кожице плода соответственно.

Данные экспрессионного анализа показали отсутствие транскриптов *CaMYB1* и *CaMYB1-like* в исследуемых образцах. В случае сортов Самоцвет и Рождественский букет все остальные анализируемые гены транскрибировались во всех тканях, за исключением экспрессии *CaCHI* в кожице плода (рис. 7).

В случае сорта Эврика низкие уровни транскриптов четырех генов (*CaMYB113*, *CaMYC*, *CaF3H* и *CaUFGT1*) были обнаружены в кожице плода; в лепестках цветка присутствовала мРНК трех генов (*CaCHS*, *CaCHI* и *CaF3H*) и в листьях – одного (*CaCHI*) (рис. 7,б–к). Таким образом, регуляторные гены показывали слабую активность и только в кожице незрелого плода данного сорта.

Уровень экспрессии генов *CaMYB113* и *CaMYC* в кожице плода у сорта Эврика был значительно ниже экспрессии генов у двух других сортов, где мРНК *CaMYB113* и *CaMYC* детектировалась также в листьях и лепестках (рис. 7,б, в). При этом наибольшие межсортовые различия наблюдались для гена *CaMYB113*. Так, в сравнении с сортами Рождественский букет и Самоцвет уровень транскриптов *CaMYB113* в кожице плода сорта Эврика был ниже в 31–40 и 48–72 раза соответственно. Отметим также, что у сорта Рождественский букет уровень транскриптов *CaMYB113* в листьях, лепестках и кожице плода был сопоставим, тогда как у сорта Самоцвет сходный уровень экспрессии в лепестках и кожице плода был ниже, чем в листьях (рис. 7,б).

Профиль экспрессии второго регуляторного гена *CaMYC* никак не согласовался с профилем *CaMYB113*. Сопоставимые уровни транскриптов *CaMYC* в листьях и лепестках сорта Рождественский букет превышали экспрессию гена в кожице плода в ~7 раз. У сорта Самоцвет экспрессия *CaMYC* была наиболее высокой в листьях, превышая уровень транскриптов гена в лепестках и кожице плода в 5.1 и 3.5 раза соответственно (рис. 7,в).

Несмотря на то что транскрипты структурных генов присутствовали во всех анализируемых органах сортов Рождественский букет и Самоцвет, профиль экспрессии этих генов значительно ва-

рировал между сортами. Так, количество мРНК *CaCHS*, *CaCHI*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUFGT1* и *CaGSTF12* было наибольшим в лепестках (Рождественский букет) или листьях (Самоцвет), а *CaF3H* – в кожице плода (Рождественский букет) или в лепестках и кожице плода (Самоцвет) (рис. 7,г–к).

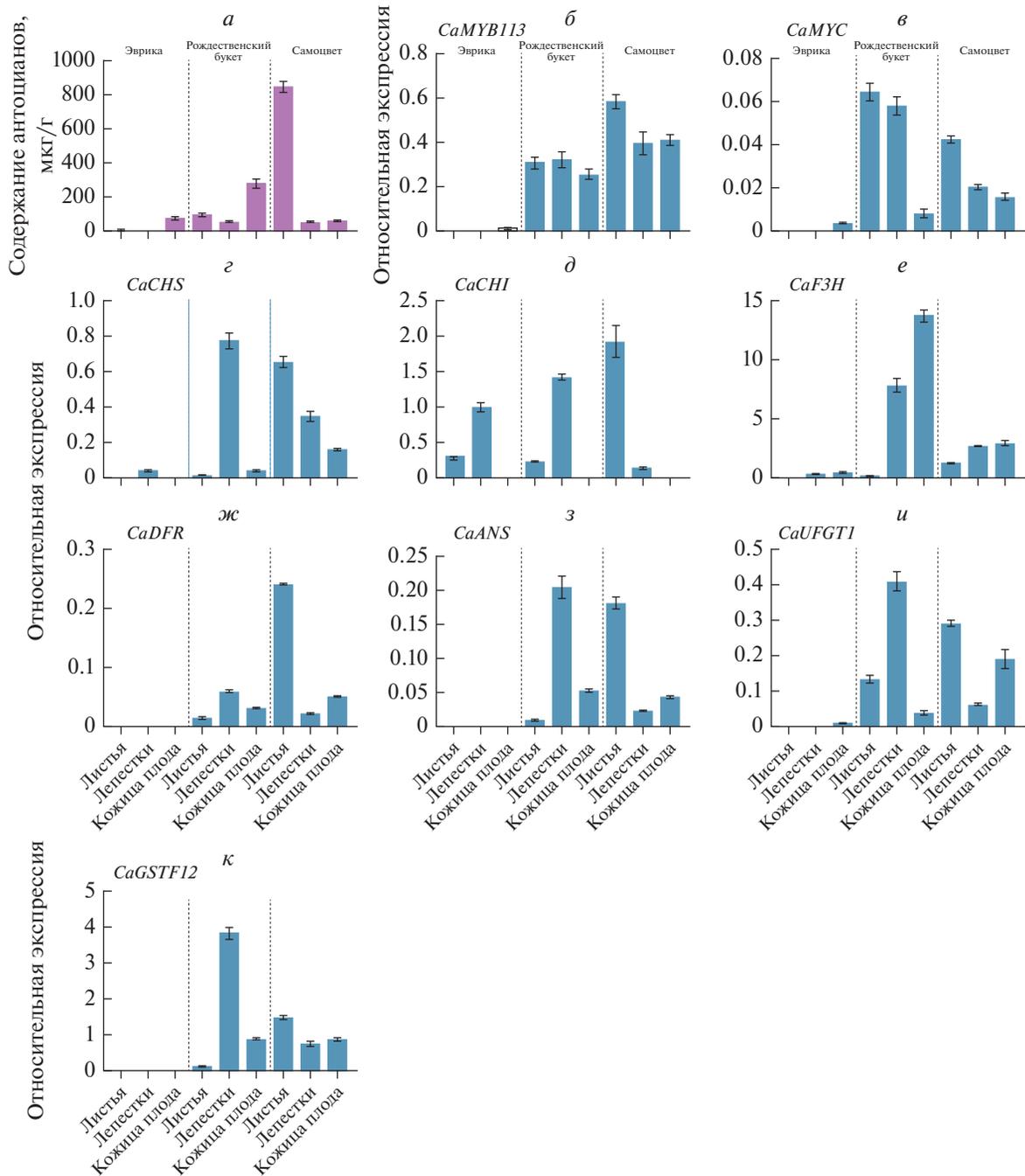
Профили экспрессии анализируемых генов были сопоставлены с содержанием антоцианов. В результате с учетом совокупных данных по исследуемым органам для всех трех сортов перца была обнаружена положительная корреляция ( $r = 0.93$ ,  $p$ -value = 0.0002) суммы антоцианов с уровнем транскриптов гена *CaDFR*. В случае остальных генов значимых корреляций показано не было ( $r = 0.08$ – $0.61$ ,  $p$ -value > 0.05). Анализ данных по отдельным органам трех исследуемых сортов выявил значимую корреляцию для генов *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS* и *CaCSTF12* ( $r = 0.99$ ,  $p$ -value < 0.05) по отношению к содержанию антоцианов в листьях.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была проведена оценка возможных корреляций содержания антоцианов с уровнем экспрессии регуляторных и структурных генов пути биосинтеза антоцианов. В качестве объекта исследований были использованы десять сортов трех родственных видов (*C. annuum*, *C. frutescens* и *C. chinense*), которые различались присутствием/отсутствием фиолетовой пигментации листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода (табл. 1, рис. 1).

В результате проведенных экспериментов была продемонстрирована прямая зависимость окраски органов (табл. 1) от суммы антоцианов (рис. 7,а), которая, в свою очередь, положительно коррелировала с активностью структурных (*CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*) и транспортно-го (*CaCSTF12*) генов в листьях сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (рис. 7). В целом это дополняет данные по структурным генам пути биосинтеза антоцианов у перца, полученные нами ранее [5, 7, 25].

В MBW-комплексе, который регулирует транскрипцию генов флавоноидного пути, главная роль принадлежит ТФ R2R3-MYB. От представителя семейства, входящего в комплекс, зависит тип воздействия на ген: активация или подавление транскрипции и, как следствие, усиление или ослабление синтеза антоцианов [26]. Из трех генов данного семейства, проанализированных в настоящей работе (*CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*), которые кодируют гомологичные белки (рис. 2), только *CaMYB113* экспрессировался в исследуемых образцах перца (рис. 7,б). Нетранскрибируемые *CaMYB1* и *CaMYB1-like* являются го-



**Рис. 7.** Содержание антоцианов (а) и профили экспрессии генов *CaMYB113* (б), *CaMYC* (в), *CaCHS* (г), *CaCHI* (д), *CaF3H* (е), *CaDFR* (ж), *CaANS* (з), *CaUFGT1* (и) и *CaGSTF12* (к) в листьях, лепестках цветка и кожице незрелых плодов сортов перца Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (*S. frutescens*).

мологами гена *ANT1* *S. lycopersicum* (рис. 3,а). Интересно, что именно *ANT1*, а не *AN2* (*MYB113*) считается ответственным за фиолетовую пигментацию кожицы плода томата с генотипом *ANTHOCYANIN FRUIT*, интрогрессированным из родственного вида *S. chilense* [27]. Таким образом, регуляция биосинтеза антоцианов имеет существенные видоспецифичные особенности.

Структурный анализ *CaMYB113* определил ген в кладе *MYB113* Solanaceae (рис. 3,а), члены которой тесно ассоциированы с биосинтезом антоцианов у картофеля, томата и баклажана [16–19]. Принимая во внимание результаты недавних исследований [20] и последнюю версию сборки генома перца *S. annuum* (GCF\_002878395.1), мы допускаем, что отсутствие ожидаемых корреляций

между активностью гена *CaMYB113* и содержанием антоцианов связано с инделем ретротранспозона *LINE-1* в первом интроне *CaMYB113*. Инсерция *LINE-1* ассоциирована с положительной регуляцией транскрипции *MYB113* и, как следствие, с повышенным содержанием антоцианов и фиолетовой окраской ткани [20, 22].

Анализ мРНК *CaMYB113* сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет подтвердил наличие 5'-UTR (рис. 5). Исходя из фиолетовой окраски кожицы незрелого плода у семи из десяти исследуемых в настоящей работе сортов (табл. 1), было сделано предположение о присутствии в геноме этих сортов второго аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией *LINE-1*. Тестирование на возможное присутствие вставки *LINE-1* показало, что только сорта Рождественский букет и Самоцвет (*C. frutescens*), у которых фиолетово пигментированы не только кожица плода, но также листья и лепестки цветков (рис. 1), имеют второй вариант аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией *LINE-1* (аллель *CaMYB113-L1*) (рис. 6, в). Третий сорт с фиолетовой окраской всех анализируемых тканей (листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода), Pimente da Neyde (*C. chinense*), не показал инсерции *LINE-1* (рис. 6, в). Поскольку данный ген экспрессируется в кожице плода Pimente da Neyde на сопоставимом с данными по сорту Самоцвет уровне [25], отсутствие подтверждения инсерции может быть связано либо с генотип-специфичными полиморфизмами в последовательности *LINE-1*, либо с особенностями регуляции транскрипции *MYB113* у вида *C. chinense* в сравнении с *C. frutescens*.

Присутствие мРНК *CaMYB113* во всех органах сортов Рождественский букет и Самоцвет, а также ее отсутствие (за исключением следовых количеств в кожице плода) у сорта Эврика (рис. 7, б, в) свидетельствуют в пользу предположения о положительном влиянии инсерции *LINE-1* на экспрессию гена. Учитывая тот факт, что четыре сорта (Сиреневый куб, Отелло, Янтарь и Эврика) с фиолетовой окраской кожицы плода отличаются от сортов Рождественский букет и Самоцвет непигментированными листьями и лепестками цветка (табл. 1, рис. 1), можно предположить, что присутствие аллеля *CaMYB113-L1* сцеплено с синтезом антоцианов в листьях и лепестках цветка видов *Capsicum*.

Существенно более высокая экспрессия структурных генов у сортов Рождественский букет/Самоцвет в сравнении с сортом Эврика (рис. 7, г–к) подтверждает роль ТФ MYB113 в MBW-комплексе как активатора транскрипции генов ферментов флавоноидного пути.

Таким образом, в настоящей работе была выявлена положительная корреляция содержания антоцианов с активностью структурных (*CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*) и транспортного (*CaCSTF12*) генов в листьях сортов перца *C. frutescens* с разным паттерном пигментации надземных органов. Было показано, что из трех регуляторных генов семейства R2R3-MYB, *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*, в исследуемых органах перца экспрессируется только *CaMYB113*, входящий в кладу *MYB113* Solanaceae. Было подтверждено присутствие 5'-UTR в мРНК *CaMYB113*. Десять сортов перца были исследованы на наличие вставки *LINE-1* в 5'-UTR *CaMYB113*. У сортов Рождественский букет и Самоцвет, характеризующихся фиолетовой окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода, был детектирован вариант аллеля *CaMYB113-L1*, тогда как в геноме сортов с другим паттерном пигментации он отсутствовал.

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

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 об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moscone E.A., Scaldaferrero 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>
2. 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>
3. 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>
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. 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>
6. Tang B., Li L., Hu Z. et al. Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper // J. Agric. Food. Chem. 2020. V. 68. P. 12152–12163. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02460>
7. 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. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090064>
8. 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>
9. 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>
10. Pérez-Díaz R., Madrid-Espinoza J., Salinas-Cornejo J. et al. Differential roles for *VviGST1*, *VviGST3*, and *VviGST4* in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01166>
11. Ramsay N.A., Glover B.J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 63.
12. 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>
13. Chaim A.B., Borovsky Y., De Jong W., Paran I. Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10.1, a major fruit-shape QTL in pepper // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 889–894.
14. Wang D., Bosland P.W. The genes of *Capsicum* // Hort-Science. 2006. V. 41. P. 1169–1187.
15. 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>
16. Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H. et al. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning // Plant J. 2011. V. 65. P. 771–784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04465.x>
17. Liu Y., Lin-Wang K., Espley R.V. et al. Functional diversification of the potato R2R3-MYB anthocyanin activators AN1, MYBA1, and MYB113 and their interaction with basic helix-loop-helix cofactors // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 2159–2176. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw014>
18. Strygina K.V., Kochetov A.V., Khlestkina E.K. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues // BMC Genet. 2019. V. 20. Article 27. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0728-x>
19. Shi S., Liu Y., He Y. et al. R2R3-MYB transcription factor SmMYB75 promotes anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Scientia Horticulturae. 2021. V. 282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110020>
20. Ohno S., Ueno M., Doi M. Differences in the CaMYBA genome between anthocyanin-pigmented cultivars and non-pigmented cultivars in pepper (*Capsicum annuum*) // Hort. J. 2020. V. 89. P. 30–36. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-097>
21. Zhou Y., Mumtaz M.A., Zhang Y. et al. Response of anthocyanin biosynthesis to light by strand-specific transcriptome and miRNA analysis in *Capsicum annuum* // BMC Plant Biol. 2022. V. 22. Article 79. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03423-6>
22. Jung S., Venkatesh J., Kang M.Y. et al. A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum* // Plant Sci. 2019. V. 287. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110181>
23. Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов // Генетика. 2023. Т. 59. № 5. С. 517–529.
24. 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.
25. Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Содержание антоцианов в плодах видов *Capsicum* коррелирует с уровнями транскрипции структурных и регуляторных генов флавоноидного пути // Физиол. растений. 2023. Т. 70. С. 36–44. <https://doi.org/10.31857/S001533032260036X>
26. Liu W., Feng Y., Yu S. et al. The flavonoid biosynthesis network in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
27. Schreiber G., Reuveni M., Evenor D. et al. ANTHOCYANIN1 from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the ANTHOCYANIN FRUIT phenotype of tomato // Theor. Appl. Genet. 2012. V. 124. P. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1705-6>

## Relationship of the Anthocyanin Content with the Expression Level of the Anthocyanin Biosynthesis Pathway Regulatory and Structural Genes in *Capsicum* L. Species

M. A. Filyushin<sup>a</sup>, \*, A. V. Shchennikova<sup>a</sup>, and E. Z. Kochieva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: michel7753@mail.ru

In this study, the content of anthocyanins and the expression pattern of regulatory (*CaMYB113*, *CaMYB1*, and *CaMYB1*-like) and structural (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUGT1*, and *CaGSTF12*) genes of the anthocyanin biosynthesis pathway in leaves, flower petals, and peel of unripe fruits of pepper *Capsicum frutescens* L. cultivars (Samotsvet, Rozhdestvenskii buket and Eureka), which differ in the pattern of anthocyanin-mediated pigmentation of aboveground organs. A positive correlation was found between the levels of *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, and *CaCSTF12* transcripts with the amount of anthocyanins in the leaves of these cultivars. It was shown that out of three regulatory genes only *CaMYB113* is expressed. Using ten cultivars of three *Capsicum* species as an example, the presence of 5'-UTR in *CaMYB113* mRNA was confirmed. The second variant of the *CaMYB113* allele with the insertion of the *LINE-1* retrotransposon in intron I was found in the genome of cv. Rozhdestvensky buket and Samotsvet with purple color of the analyzed organs.

**Keywords:** *Capsicum* spp., pepper cultivars, anthocyanins biosynthesis, MYB113, the content of anthocyanins, gene expression.