

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ЦИРКАДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КАРОТИНОИДОВ (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) В ЛИСТЬЯХ ТОМАТА *SOLANUM LYCOPERSICUM* L.

© 2024 г. М. А. Филюшин¹*, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева

Представлено академиком В. О. Поповым

Поступило 24.06.2024 г.

После доработки 30.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Охарактеризована циркадная динамика экспрессии ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) в фотосинтезирующей ткани растений томата *Solanum lycopersicum* L. (сорт Корнеевский). Осуществлен *in silico* анализ профиля экспрессии генов и обнаружен высокий уровень их транскриптов в листовой ткани растения томата. Проведен анализ (ПЦР-РВ) профиля экспрессии генов в шести временных точках в течение суток и показано, что наибольший уровень транскриптов *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* приходится на вторую половину световой фазы, тогда как *CRTRB1* – на окончание темновой фазы. Определено содержание и состав каротиноидов в листовой ткани в середине дневного периода и показано, что соединений ϵ/β -ветви биосинтеза каротиноидов накапливается в 1.5 раза больше, чем соединений β/β -ветви.

Ключевые слова: томат, *Solanum lycopersicum*, метаболизм каротиноидов, циркадный ритм

DOI: 10.31857/S2686738924050191

Каротиноиды представляют собой пигменты, используемые растением в первую очередь в качестве вспомогательных соединений для фотосинтеза и фотозащиты, а также для окраски тканей генеративных и запасающих органов (лепестков, плодов, зерен, др.) [1–3]. Апокаротиноиды, являющиеся производными каротиноидов, включают фитогормоны (стриголактоны, абсцизовая кислота (АБК)) и другие биологически активные соединения, незаменимые для онтогенеза и адаптивных реакций растения [1–3].

Путь биосинтеза каротиноидов начинается с образования 15-*цис*-фитоина, катализируемого фитинсинтазой *PSY* [1]. На примере многих видов растений показано существование трех изоферментов *PSY1–3*, осуществляющих главную консервативную функцию (катализ синтеза фитоина) [2, 3]. Детальная характеристика кодирующих их генов у томата (*Solanum lycopersicum* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) выявила характерные особенности каждого из них, заключающиеся в преимущественной

активности в плодах/зернах (*PSY1*) и листьях (*PSY2*) или значимой транскрипцией в корнях только в ответ на стрессовые факторы (*PSY3*) [2, 3]. Для фотосинтезирующих тканей наиболее важен хлоропласт-специфичный изофермент *PSY2*, регуляция экспрессии которого светочувствительна и, как следствие, колеблется в соответствии с циркадными ритмами [3, 4]. Кроме того, именно активность *PSY2* связывают с усилением синтеза АБК в семенах и корнях растений томата в условиях солевого стресса [3].

После образования *транс*-ликопина путь биосинтеза каротиноидов расходится на две ветви – β/β (образуются β -каротин и ксантофиллы виолаксантинного цикла) и ϵ/β (α -каротин и ксантофиллы лютеинового цикла), первыми ферментами, в которых являются ликопин- β -циклаза (*LCYB*) и ликопин- ϵ -циклаза (*LCYE*), соответственно [1]. Ветвь β/β снабжает растение фитогормонами и основными предшественниками витамина А (β -каротин и β -криптоксантин, получаемый из β -каротина с помощью β -каротингидроксилазы 1 (*CrtRB1*)) [5, 6]. Гормон АБК, в частности, образуется путем окислительного расщепления неоксантина и виолаксантина 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназами (*NCED*) [7, 8]. Ключевая роль здесь приписывается изоферменту *NCED1* на основании данных

¹Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Москва, Россия
*e-mail: michel7753@mail.ru

исследования развития плода и стрессоустойчивости растений томата [8–10].

Наша работа была сфокусирована на определении циркадной динамики экспрессии четырех ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1*, *NCED1*) в фотосинтезирующей ткани *S. lycopersicum*.

Изучение каротиногенеза у томата в основном ограничено работами по окраске плода и механизмах устойчивости к некоторым стрессовым факторам и не касается суточных колебаний генной экспрессии [3, 8–10]. Однако, это важно для онтогенеза растения с учетом, к примеру, светочувствительной регуляции генов и длительности фотопериода. В зависимости от времени суток происходит открытие и закрытие устьиц на поверхности листа — процесс, который модулируется с помощью АБК и который влияет на степень засухоустойчивости растения [11].

Некоторые сведения о циркадной динамике анализируемых нами генов можно почерпнуть из работ по кукурузе, водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и *Arabidopsis thaliana* L.: наибольшие уровни экспрессии *PSY2*, *LCY* и *NCED* регистрируются в световой фазе суток (начало, середина и конец дня соответственно) [12–14]. В случае гена *CrtRB1* сведений не найдено.

Используя доступные транскриптомные данные модельных сортов томата (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>), мы провели предварительный анализ профиля экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* в различных органах растения с целью оценки возможной активности генов в фотосинтезирующей ткани листа. Логично предположить, что ткани для транскриптомного анализа собирали в дневное время, и что это время может отличаться для разных тканей.

В результате было показано, что уровень экспрессии всех четырех генов очень низок в корнях, но высок в листьях, где количество транскриптов *PSY2* и *LCYE* в 3–4 раза выше, чем у *CrtRB1* и *NCED1* (рис. 1). Это подтверждает роль данных генов в фотосинтезе растения, а также в образовании гормона АБК, необходимого для развития. Также, относительно высокий уровень транскриптов наблюдался в бутонах цветка (*PSY2*, *CrtRB1*) и плодах по мере созревания (*NCED1*) (рис. 1). Это свидетельствует о возможном вспомогательном участии роли *PSY2* в каротиногенезе в запасующих тканях цветка и о необходимости *NCED1* для синтеза АБК в созревающем плоде, что согласуется с данными [3, 8–10].

Определение циркадной динамики экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* в листьях *S. lycopersicum* было проведено на сорте Корнеевский. Проростки томата были выращены до стадии 5–7 листа (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН). С учетом условий культивирования (день/

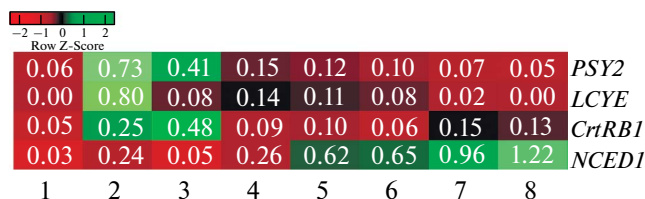


Рис. 1. Тепловая карта экспрессии генов *PSY2* (Solyc02g081330; NCBI gene ID 543964), *LCYE* (Solyc12g008980; 544129), *NCED1* (Solyc07g056570; 544163) и *CrtRB1* (Solyc06g036260; 544133) в растении томата сорта Heinz (*S. lycopersicum*), построенная по транскриптомным данным TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>). Анализируемые органы: корень (1); лист (2); бутон (3); плод диаметром 1 (4), 2 (5) и 3 (6) см; плод незрелый финального размера (7); плод на стадии смены окраски с зеленой на красную (8). Визуализация данных (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) проведена на основании значений FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments), указанных в боксах (округлены до второго знака после запятой).

ночь — 16 ч/8 ч; световая фаза с 7.00 до 23.00) были выбраны шесть временных точек (3.00, 6.00, 8.00, 15.00, 22.00, 24.00), в которых с проростков были собраны листья. Из листьев были получены препараты суммарной РНК и кДНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия; GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Анализ экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* был проведен с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ; программа [5 мин 95°C, 40 циклов (15 с 95°C; 40 с 60°C)]) в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием набора “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО «Синтол», Россия).

В результате было показано, что уровни экспрессии каждого гена достоверно различаются между временными точками, кроме *PSY2* (15.00 vs. 22.00; 6.00 vs. 8.00), *LCYE* (6.00 vs. 8.00) и *NCED1* (3.00 vs. 8.00, 24.00; 6.00 vs. 15.00, 22.00) (рис. 2а).

Пик активности *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* пришелся на вторую половину дня. В начале темновой фазы (24.00) экспрессия всех трех генов *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* снижалась, однако далее динамика была индивидуальной. К 3.00 (vs. 24.00) уровень транскриптов *NCED1* не менялся, *PSY2* повышался и *LCYE* уменьшался, тогда как к концу ночи (6.00 vs. 3.00) уровень транскриптов *NCED1* увеличивался, *PSY2* снижался и *LCYE* уменьшался (рис. 2а). Полученные данные о преимущественной активности генов *PSY2* и *LCYE* в дневное время согласуются с известным участием каротиноидов в поглощении света и защите молекул хлорофиллов от не обратимого фотоокисления [1] и с тем, что днем

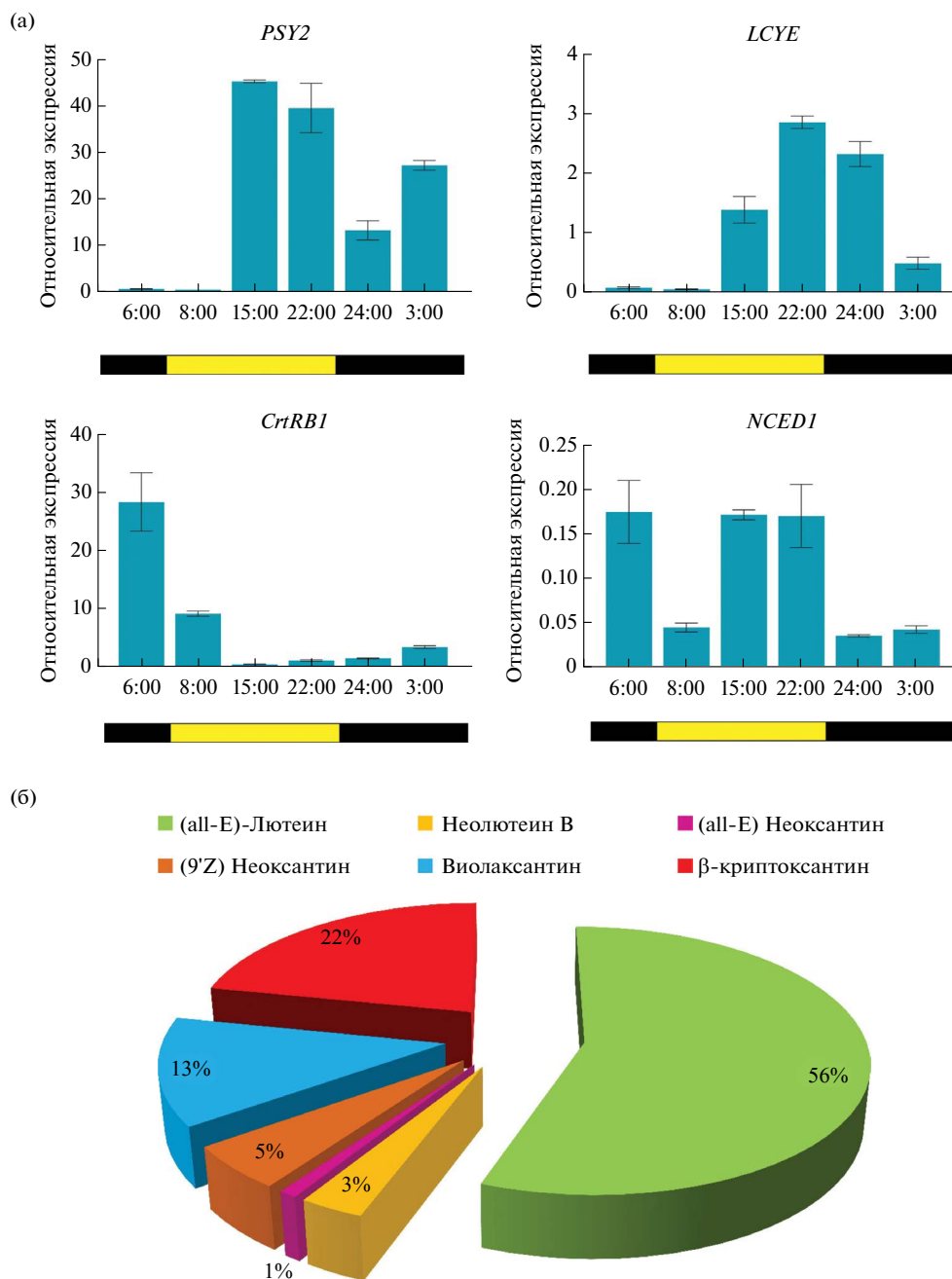


Рис. 2. (а) Суточная динамика экспрессии генов *PSY2* (Solyc02g081330; NCBI gene ID 543964), *LCYE* (Solyc12g008980; 544129), *NCED1* (Solyc07g056570; 544163) и *CrtRBI* (Solyc06g036260; 544133) в листовой ткани проростков образцов томата сорта Корнеевский. Дневной и ночной периоды обозначены под графиками белым и серым боксами соответственно. Праймеры: *PSY2* (5'-aactgagctctgctagtagatg-3', 5'-gcactagagatcttgcataagca-3'); *LCYE* (5'-tatgtcagacacgacgctcaat-3', 5'-catgctagcagcagcacca-3'); *NCED1* (5'-tgctcttagctacgatgtgat-3', 5'-gcgaatcatgcatcattgttg-3'); *CrtRBI* (5'-cactcttatcaatgaggaagg-3', 5'-cttactgaataagagaccta-3'). Данные нормализованы по двум референсным генам *Expressed* (gene ID 101263039; 5'-gctaagaacgctggaccta-3', 5'-tgggtgtgcctttctgaatg-3') и *actin-7* (101262163; 5'-cattgtgctcagtggtgttc-3', 5'-tctgctggaaggtgctaagt-3'). Согласно результатам статистического анализа данных (Two-way ANOVA; GraphPad Prism v. 8, GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>), уровни экспрессии каждого гена достоверно различаются ($p < 0.05$) между временными точками, кроме *PSY2* (15.00 vs. 22.00; 6.00 vs. 8.00), *LCYE* (6.00 vs. 8.00) и *NCED1* (3.00 vs. 8.00, 24.00; 6.00 vs. 15.00, 22.00). (б) Состав каротиноидов (%) в листьях проростков томата сорта Корнеевский, собранных в середине дневной фазы фотосинтеза (15.00). Суммарное количество каротиноидов – 307.3 мкг/г сырого веса. Суммарное содержание каротиноидов (мг/г сырого веса) и их состав (% от суммы каротиноидов отдельных соединений) определяли согласно [15] в двух биологических и трех технических повторях.

содержание каротиноидов в листьях обычно растёт, а ночью падает [6]. Сходная по уровню экспрессия *NCED1* в световой и темновой фазах находится в соответствии с участием гена в синтезе гормона АБК как необходимой составляющей постоянно идущего развития растения [7, 8]. В сравнении с данными о циркадной экспрессии гомологичных генов у других видов растений [12–4], у томата ген *PSY2* показал сходный профиль экспрессии, тогда как профиль *LCYE* и *NCED1* имел некоторые отличия, что может указывать на видоспецифичную регуляцию данных генов.

В противоположность генам *PSY2*, *LCYE* и *NCED1*, пик активности *CrtRBI* пришёлся на конец ночи (6.00). В начале световой фазы (8.00) экспрессия гена снизилась почти в 3 раза и дальше (15.00) продолжила падение до следовых значений: в самом конце световой фазы начался постепенный рост уровня транскриптов *CrtRBI* (рис. 2а). Исходя из этого, можно предположить, что преобразование β -каротина в β -криптоксантин наиболее интенсивно происходит на стыке ночи и дня (6.00–8.00), что может быть связано с наработкой ксантофиллов виолаксантинового цикла (β/β -ветвь) в количестве, необходимом растению для участия в наступающем фотопериоде. При этом низкий уровень дневной экспрессии *CrtRBI* может свидетельствовать о наработке ксантофиллов лютеинового цикла, синтезируемых ϵ/β -ветвью и участвующих в дневном поглощении света и защите хлорофилла.

Чтобы прояснить данный вопрос, мы провели HPLC-анализ содержания и состава каротиноидов (согласно [15]) в листовой ткани растения томата, собранной в 15.00. В результате было показано, что большая часть (~60%) каротиноидов представлена производными лютеина, и 40% – ксантофиллами виолаксантинового цикла (рис. 2б). Таким образом, соединения ϵ/β -ветви могут выполнять большую (в сравнении с β/β) часть функции каротиноидов в фотосинтезе и фотозащите, поскольку ксантофиллы β/β -ветви активно расходуются на синтез необходимых растению фитогормонов.

Отдельно заметим, что снижение экспрессии гена *CrtRBI* может способствовать накоплению β -каротина, а высокий уровень транскриптов *LCYE* – накоплению α -каротина [1, 5, 6]. Однако в середине дня (15.00) при следовых количествах транскриптов гена *CrtRBI* и существенных *LCYE* (рис. 2а) ни β -каротина, ни α -каротина в составе каротиноидов обнаружено не было (рис. 2б).

Таким образом, впервые была определена циркадная динамика экспрессии ключевых генов метаболизма каротиноидов в фотосинтезирующей ткани томата. Было показано, что профиль экспрессии гена *PSY2* может носить консервативный характер у видов растений, тогда как *LCYE* и *NCED1* могут иметь видоспецифичные особенности. Суточная динамика экспрессии *CrtRBI* была для растений

определена впервые. Наибольшая активность генов *PSY2* и *LCYE* была зарегистрирована в световой фазе суток, что согласуется с усиленным накоплением каротиноидов и их ролью в фотосинтезе и фотозащите растения. Максимальные уровни транскриптов гена *NCED1* предполагают усиленный синтез фитогормона АБК во второй половине световой фазы и в конце темновой фазы. Показана сопоставимая по количеству дневная наработка ксантофиллов виолаксантинового и лютеинового циклов, при этом меньшее количество первых может указывать на активную переработку соединений на фитогормоны.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-16-00043, подготовка растительного материала, экспрессионный анализ) и Министерства образования и науки РФ (биохимический анализ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stra A., Almarwaey L.O., Alagoz Y., et al. // Front. Plant Sci. 2023. V. 13. 1072061.
2. Stauder R., Welsch R., Camagna M., et al. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. 255.
3. Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., et al. // Plant Physiol. 2008. V. 147(3). P. 1334–1346.
4. Ezquerro M., Burbano-Eraza E., Rodriguez-Concepcion M. // Plant Physiol. 2023. V. 193(3). P. 2021–2036.
5. LaPorte M.F., Vachev M., Fenn M., et al. // G3 (Bethesda). 2022. V. 12(3). jkac006.
6. Hu L., Feng S., Liang G., et al. // AMB Express. 2021. V. 11(1). 83.
7. López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., et al. // New Phytol. 2010. V. 187. P. 343–354.
8. Zhang M., Yuan B., Leng P. // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1579–1588.
9. Kai W., Fu Y., Wang J., Liang B., et al. // Sci Rep. 2019. V. 9. 16943.
10. Yang R., Yang T., Zhang H., et al. // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 77. P. 23–34.
11. Yari Kamrani Y., Shomali A., Aliniaieifard S., et al. // Cells. 2022. V. 11(7). 1154.

12. Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., et al. // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1334–1346.
13. Sun T.H., Liu C.Q., Hui Y.Y., et al. // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. P. 868–878.
14. Baek D., Kim W.Y., Cha J.Y., et al. // Plant Physiol. 2020. V. 184(1). P. 443–458.
15. Efremov G.I., Ashikhmin A.A., Shchennikova A.V., et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. V. 70(2). P. 17

CIRCADIAN REGULATION OF EXPRESSION OF CAROTENOID METABOLISM GENES (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) IN LEAVES OF TOMATO *SOLANUM LYCOPERSICUM* L.

M. A. Filyushin^{1, #}, A. V. Shchennikova¹, E. Z. Kochieva¹

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

¹*Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

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

The circadian dynamics of the expression of key genes of carotenoid metabolism (*PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1*, and *NCED1*) in the photosynthetic tissue of tomato *Solanum lycopersicum* L. (cultivar Korneevsky) plants was characterized. An *in silico* analysis of the gene expression pattern was carried out and a high level of their transcripts was detected in the leaf tissue. qRT-PCR analysis of gene expression was performed at six time points during the day and found the highest levels of *PSY2*, *LCYE* and *NCED1* transcripts in the second half of the light phase, and *CrtRB1* – at the end of the dark phase. The content and composition of carotenoids in leaf tissue in the middle of the day was determined and it was shown that the leaf accumulates 1.5 times more compounds of the ϵ/β -branch of carotenoid biosynthesis pathway than compounds of the β/β -branch.

Keywords: tomato, *Solanum lycopersicum*, carotenoid metabolism, circadian rhythm