

На правах рукописи

Ефремов Глеб Ильич

**Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза каротиноидов у
культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции *Lycopersicon***

Специальность: 1.5.7 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2024

Работа выполнена в группе лаборатории системной биологии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Кочиева Елена Зауровна,
заведующая лабораторией системной биологии
растений Института Биоинженерии ФИЦ
Биотехнологии РАН, Москва

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Потокина Елена Кирилловна,
профессор кафедры почвоведения и лесных культур
института леса и природопользования Федерального
государственного бюджетного учреждения высшего
образования «Санкт-Петербургский государственный
лесотехнический университет имени С.М. Кирова»,
г. Санкт-Петербург

кандидат биологических наук
Дивашук Михаил Георгиевич,
заведующий лабораторией прикладной геномики и
частной селекции сельскохозяйственных растений
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН),
г. Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 2024 года в __ часов на заседании диссертационного совета
24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург,
ул.Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: www.vir.nw.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук



Новикова Любовь Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы: Каротиноиды представляют собой одни из основных вторичных метаболитов, синтезируемых *de novo* во всех фотосинтезирующих организмах. Основная функция каротиноидов у растений связана с участием в фотосинтезе и защите от оксидативного стресса (Uarrotta et al., 2018, Wurtzel, 2019). Также каротиноиды, являясь предшественниками биосинтеза фитогормонов абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов, участвуют в онтогенезе растения. (Sun et al., 2022). Недавние исследования показали участие каротиноидов и их производных в формировании устойчивости растений к различным абиотическим стрессам (Moreno et al., 2020; Zhang et al., 2021; Orsak et al., 2023). Кроме того, каротиноиды являются аттрактантами, придающими цветкам и плодам яркую окраску, тем самым способствуя опылению и распространению семян (Serra, 2015; Maoka, 2020). Каротиноиды критически важны для человека прежде всего как антиоксиданты, супрессоры воспалительных процессов и онкогенеза, источники провитамина А (Rodríguez-Rodríguez et al., 2022). Значимость каротиноидов для растений и человека способствовала существенному прогрессу в понимании их метаболизма. Был определён путь биосинтеза каротиноидов и, преимущественно на модельных растениях, охарактеризованы контролирующие его гены (Ruiz-Sola, 2012; Stanley et al., 2019; Sun et al., 2022 и др.).

Род *Solanum* секция *Lycopersicon* включает один культивируемый (*S. lycopersicum*) и 12 дикорастущих видов томата, образующих плоды, окраска которых зелёная либо представлена различными оттенками желто-красного спектра, что зависит от качественного и количественного состава синтезируемых и накапливаемых каротиноидов (Kilambi et al., 2021; Ezquerro et al., 2023). Виды секции *Lycopersicon* делятся на эволюционно более ранние, зеленоплодные (*S. pennellii* Correll, *S. habrochaites* Knapp, Spooner, *S. huaylasense* Peralta, *S. peruvianum* L., *S. corneliomulleri* Macbr., *S. chilense* (Dunal) Reiche, *S. chmielewskii* Rick, *S. arcanum* Peralta, *S. neorickii* Spooner), эволюционно более поздние, желтоплодные (*S. cheesmaniae* (Riley) Fosberg, *S. galapagense* Darwin, Peralta) и наиболее молодые, красноплодные (*S. pimpinellifolium* L., *S. lycopersicum* L.) (Peralta et al., 2008). Однако изучение генных путей биосинтеза каротиноидов в плодах томата сфокусировано практически на одном красноплодном культивируемом виде *S. lycopersicum* и на достаточно ограниченном наборе модельных красноплодных сортов этого вида (Su et al., 2015; Liu et al., 2015; Kilambi et al., 2021; Ezquerro et al., 2023). Образцы дикорастущих видов томата, как красноплодные, так и желто- и зеленоплодные, значительно различающиеся по составу/содержанию каротиноидов в плодах, используются в исследованиях каротиногенеза либо редко (*S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*), либо почти никогда (*S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. galapagense*, *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. neorickii*). Крайне мала информация о последовательностях генов биосинтеза каротиноидов и особенностях их экспрессии и регуляции у видов томата иных, чем *S. lycopersicum*. Окраска спелого плода культивируемого и дикорастущих видов томата представлена широким спектром оттенков за счёт различий в качестве и количестве каротиноидов в связи с этим виды томата представляют собой хорошую модель для изучения синтеза и накопления каротиноидов в плодах, что позволит прояснить особенности функции и эволюции генов каротиногенеза видов секции *Lycopersicon*.

Цели и задачи исследования:

Целью данной работы стала структурно-функциональная характеристика генов метаболизма каротиноидов в различных органах и в процессе созревания плода у образцов культивируемого (сортов и линий) и дикорастущих видов томата с использованием комплексного подхода (морфофизиологического, молекулярно-генетического и биохимического).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение состава и динамики накопления каротиноидов в листьях и плодах в процессе созревания у дикорастущих и культивируемых видов томата *Solanum* секции *Lycopersicon*;
2. Определение регуляторных и кодирующих последовательностей гомологов генов каротиногенеза у видов томата, характеристика экзон-интронной структуры и полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей;
3. Определение уровней экспрессии и сравнительный межвидовой анализ транскрипции генов биосинтеза каротиноидов в различных органах, а также в динамике созревания плода у видов томата секции *Lycopersicon*.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- впервые проведён сравнительный анализ содержания общих каротиноидов, ликопина и β -каротина в листьях и плодах в процессе созревания у дикорастущих зелено-, желто- и красноплодных видов (*Solanum* секция *Lycopersicon*);
- впервые определены и охарактеризованы кодирующие и регуляторные последовательности ключевых генов биосинтеза каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у сортов и образцов дикорастущих видов томата;
- впервые проведён сравнительный межвидовой анализ транскрипции генов *PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2* в листьях, бутонах, цветках, плодах (от 2 до 4 стадий развития) красно- и зеленоплодных видов томата;
- впервые показано совместное участие генов *NCED1* и *NCED2* в процессе развития/созревания плода томата; ключевая роль отведена гену *NCED1*, наибольшая активность которого приходится на стадию смены окраски плода;
- впервые показана прямая корреляция между уровнями экспрессии гена транскрипционного фактора (ТФ) *RIN* и его генов-мишеней в динамике созревания плода красно- и зеленоплодных видов томата.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что в исследовании проанализировано содержание каротиноидов в листьях и плодах в процессе созревания, а также охарактеризованы уровни полиморфизма ключевых генов биосинтеза каротиноидов, особенности их экспрессии и регуляции у дикорастущих видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*). Результаты данной работы позволили прояснить особенности функции и эволюцию генов каротиногенеза у видов томата секции *Lycopersicon*. Предложен возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов томата. Практическая значимость работы заключается в том, что впервые сорта отечественной селекции охарактеризованы на предмет наличия двух мутаций *tangerine*; выявлены доноры мутации *tangerine 1381*. Разработанные маркеры используются в программах ФНЦО РАН для селекции оранжевоплодных сортов томата.

Положения, выносимые за защиту

- Для красноплодных и зеленоплодных видов томата характерна общая тенденция накопления каротиноидов в динамике развития плода.
- Промоторные области генов биосинтеза каротиноидов у красноплодных и зеленоплодных видов значительно различаются в наборе регуляторных элементов, связанных с тканеспецифической экспрессией, реакцией на фитогормоны и стрессовые факторы.
- Ген 15-*cis*- ζ -каротинизомеразы *Z-ISO* транскрибируется в листьях и плодах всех анализируемых видов; в процессе созревания плода экспрессия *Z-ISO* возрастает.

- Гены 9-*cis*-эпоксикаротиноид-диоксигеназ *NCED1* и *NCED2* функционируют совместно при созревании плода томата; ключевая роль принадлежит гену *NCED1*, наибольшая активность которого приходится на стадию смены окраски плода. Уровни экспрессии *NCED1* и *NCED2* обратно коррелируют с содержанием β-каротина в плодах.

- Уровень экспрессии регуляторного гена *RIN* положительно коррелирует с уровнями транскрипции его генов-мишеней.

Апробация результатов работы. Результаты диссертационной работы представлены на конференциях «125 Лет Прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 2019), на XX Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2020), на 45-м FEBS Конгрессе (FEBS 2021), на VII международной научной конференции PlantGen (Новосибирск, 2021), на V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации результатов исследований. Результаты работы опубликованы в 7 научных статьях, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора. Результаты получены лично соискателем или при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 175 страницах, включая 11 таблиц и 50 рисунков. Состоит из введения, основной части, заключения, списка литературы (включает 255 источника).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе проведен анализ научной литературы, посвященной роли и функции каротиноидов в растении. Описаны классификация каротиноидов, их биосинтез, содержание каротиноидов в различных органах и тканях растений, молекулярно-генетические факторы, приводящие к синтезу и накоплению каротиноидов. Отдельно охарактеризованы гены каротиногенеза, механизмы регуляции их биосинтеза. Подробно рассматриваются стадии созревания плодов томата и изменения в качественном и количественном составе каротиноидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована коллекция из 48 образцов томата, включающая образцы дикорастущих видов, а также сорта *S. lycopersicum* с различной окраской зрелого плода. Состав каротиноидов определен стандартными спектрофотометрическим и HPLC методами. Геномную ДНК выделяли согласно Puchooa et al., 2004 с дополнительной депротеинизацией. ПЦР продукты были клонированы в векторе pDrive Cloning Vector. Экспрессионный анализ выполняли методом qРВ-ПЦР. Тотальную РНК выделяли набором реактивов SV Total RNA Isolation System; кДНК синтезировали с помощью набора GoScript Reverse Transcription System. Выравнивание последовательностей, структурный и филогенетический анализ генов и белков проведен в программе MEGA 7.0.26. Влияние замещений аминокислотных остатков и вторичные/третичные структуры белка предсказаны с использованием программ PROVEAN (<https://bio.tools/provean>) и Phyre2 (<https://bio.tools/phyre>). Результаты РВ-ПЦР статистически обработаны в программе GraphPad Prism v. 8.02. Консервативные домены, сайты и мотивы анализировали в NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cg>), UniProt (<https://www.uniprot.org>) и программе MEME 5.1.1. Поиск регуляторных элементов выполняли с использованием базы данных

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Биохимическая характеристика состава каротиноидов в листьях и плодах образцов дикорастущих и культивируемых видов томата.

Проведен биохимический анализ содержания каротиноидов у 40 образцов, включая сорта *S. lycopersicum* с различной окраской зрелого плода и образцы дикорастущих видов (*S. pimpinellifolium* VIR1018, *S. cheesmaniae* LA0421, *S. habrochaites* LA2144, *S. pennellii* LA0716, *S. chmielewskii* LA2663, *S. neorickii* LA2133, *S. peruvianum* LA1954, *S. arcanum* LA2157).

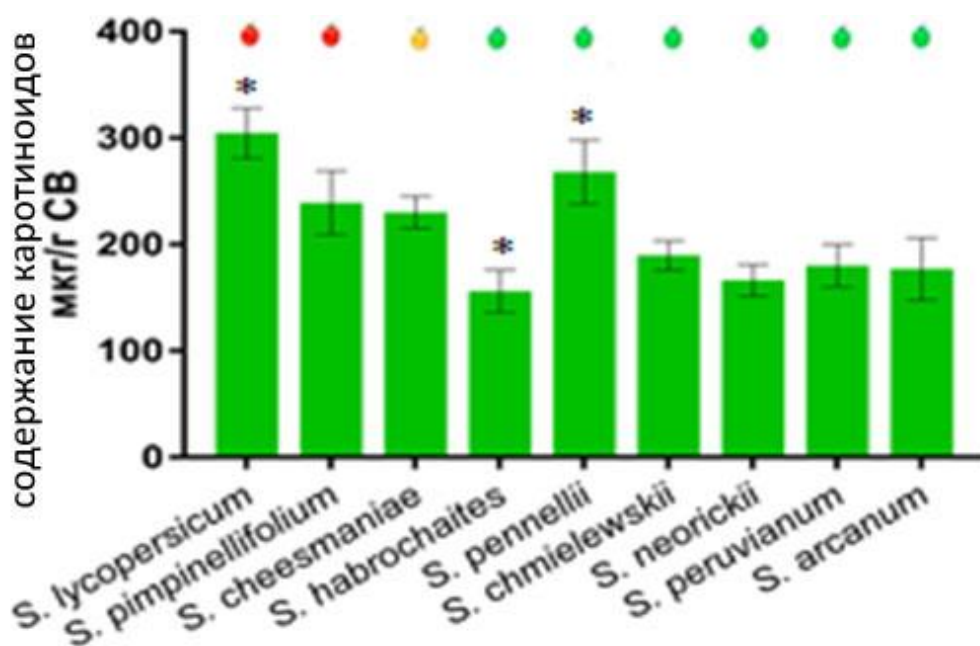


Рисунок 1– Содержание общих каротиноидов в листьях видов томата секции *Lycopersicon*. Звездочками указаны достоверные отличия. Над графиком отмечен цвет зрелых плодов у видов.

Содержание каротиноидов в листьях красно-, желто- и зеленоплодных видов было схожим; преобладающим пигментом был лютеин (184 мкг/г, 60%), β -криптоксантин (67.7 мкг/г, 22%) и виолаксантин (39 мкг/г, 13%), что совпадает с ранее полученными данными по составу каротиноидов в листьях и с тем, что именно лютеин является основным в фотосинтезирующей ткани растений (Islam et al. 2018; Dias et al. 2021; Mi et al., 2022).

HPLC анализ накопления каротиноидов в плодах в динамике созревания выявил общую тенденцию для всех анализируемых образцов красноплодных и зеленоплодных видов от низкого количества каротиноидов на стадиях IG (созревающий плод) и MG (плод максимального размера с зеленой окраской) с повышением (небольшим для зеленоплодных и резким для красноплодных видов) на стадии BR (стадия покраснения плода) и RR\FR (зрелый плод). Плоды зеленоплодных видов накапливали β -каротин на стадиях MG и FR, но в низких концентрациях (рис. 2). Ликопин в плодах зелено- и желтоплодных видов не детектировался. При этом на стадии IG и MG у всех видов томата детектировалось минимальное содержание общих каротиноидов. Основными каротиноидами у зелено- и желтоплодных видов были лютеин и виолаксантин; состав каротиноидов соответствовал таковому в фотосинтезирующих тканях.

Красноплодные виды *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* по мере созревания плода характеризовались резким повышением синтеза общих каротиноидов и прежде всего ликопина (рис.2), что совпало с динамикой, показанной ранее (Bolger et al., 2014; Kilambi et al., 2017).

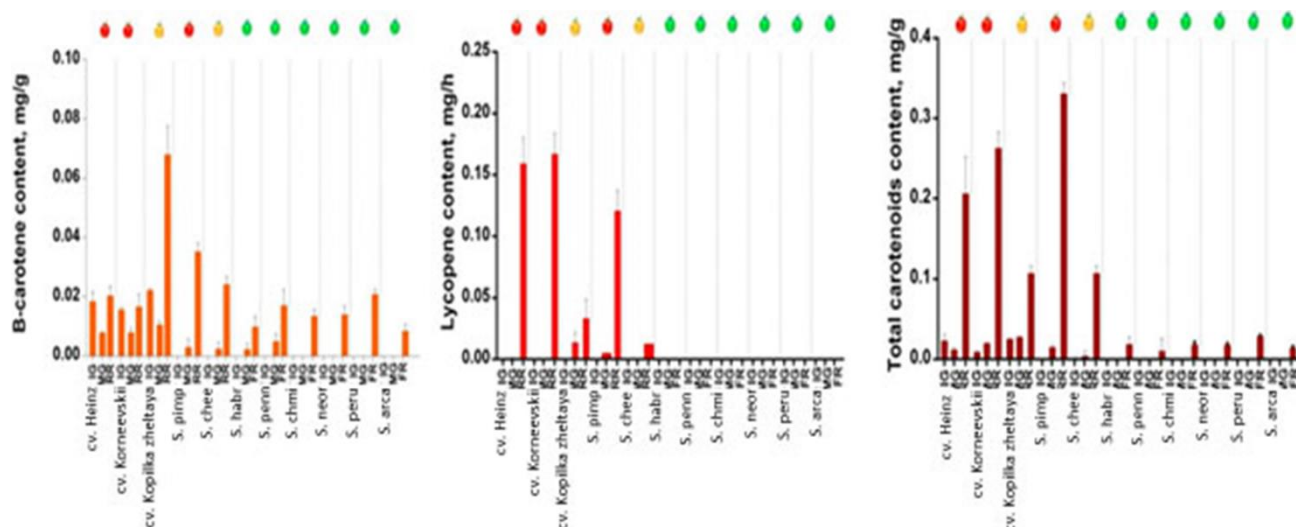


Рисунок 2 – Содержание каротиноидов в зрелых зеленых плодах (MG) и спелых плодах (RR/RF) в образцах видов томата. *S. pimpinellifolium* VIR1018 (*S. pimp*), *S. cheesmaniae* (*S. chee*) LA0421, *S. habrochaites* (*S. habr*) LA2144 и *S. pennellii* (*S. penn*) LA0716, *S. chmielewskii* (*S. chmi*) LA2663, *S. arcanum* (*S. arca*) LA2157 и *S. neorickii* (*S. neor*). Цвет зрелых плодов указан над графиком.

Также была проведена оценка содержания общих каротиноидов, ликопина и β -каротина в 32 образцах (сорта и селекционные линии) *S. lycopersicum* с различной окраской спелого плода. Наибольшее содержание β -каротина обнаружено в спелых плодах желтоплодных сортов и линий. Содержание β -каротина в красноплодных сортах было ниже, за исключением сортов с темно-красной окраской плодов (линия Л-Черри коричнево-фиолетовые, Земба, Black Cherry, Black Jack, Paul Robson). В целом полученные данные по содержанию и составу каротиноидов в спелых плодах соответствовали значениям, полученным ранее для других сортов томата (Lenucci et al., 2009; Li et al., 2013; Голубкина и др., 2016, 2017). В процессе созревания плодов зеленоплодные виды томата образовывали лютеин и ксантофиллы, содержание и состав которых сопоставим с таковым в листьях. Это согласуется с тем, что в плодах диких зеленоплодных видов активно идет процесс фотосинтеза, и именно лютеин и ксантофиллы участвуют в этих реакциях.

Таким образом, было показано, что содержание каротиноидов в листьях эволюционно более молодых красно- и желтоплодных видов и более древних зеленоплодных видов значимо не отличается ни по составу, ни по количеству, что позволяет предположить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях у видов томата.

2. Определение генов-гомологов фитоинсинтазы *PSY1* у сортов и видов *Solanum* секции *Lycopersicon*.

Первым и одним из ключевых этапов биосинтеза каротиноидов является образование 15-цис-фитоена, катализируемое фитоинсинтазой *PSY*, изоформы которой кодируются тремя генами, различающимися по органоспецифичной экспрессии. У томата именно транскрипция гена *PSY1* обеспечивает синтез каротиноидов в динамике созревания плодов (Giorio et al., 2008; Ezquerro et al., 2023).

Была идентифицирована (амплифицирована, клонирована и секвенирована) 21 последовательность гомологов генов *PSY1*, включая 5'-UTR и промоторные области, у девяти дикорастущих видов томата: красноплодного *S. pimpinellifolium* (VIR1018), желтоплодного *S.*

cheesmaniae (LA0421) и зеленоплодных видов *S. chilense* (LA1963, LA2884), *S. habrochaites* (LA12144, LA1777), *S. pennellii* (LA0716, LA192), *S. peruvianum* (LA1954), *S. chmielewskii* (LA2663), *S. neorickii* (LA2133), *S. arcanum* (LA2157), а также 12 сортов *S. lycopersicum*, различающихся по окраске плодов.

Полученные последовательности депонированы в генбанк NCBI (MN782521- MN782538).

Размер идентифицированных генов-гомологов *PSY1* у дикорастущих видов варьировал от 4840 п.н. (*S. chilense* LA1963) до 4916 п.н. (*S. habrochaites* LA1771), включая нетранслируемую область 5'-UTR. Отдельно был секвенирован промотор (~0,9 т.п.н.). Кодирующая последовательность имела длину 1239 п.н. и включала шесть экзонов, их количество и длина не различались у анализируемых видов, и была такой же, как и для идентифицированных видов *Capsicum*.

Изменчивость выявленных гомологичных генов *PSY1* у видов томата составляла 14,0% для полногеномных последовательностей (700 SNPs): 9,0% для экзонных (110 SNPs) и 14,6% для интронных последовательностей (311 SNPs). Вариабельность 5'-UTR составила 18,6% (299 SNPs в 1639 п.н.). Всего в кодирующих последовательностях было выявлено 56 несинонимичных нуклеотидных замен и обнаруживались они в основном у гомологов генов *PSY1* зеленоплодных видов томата (рис. 3). 5'-UTR и экзон I были наиболее вариабельными.

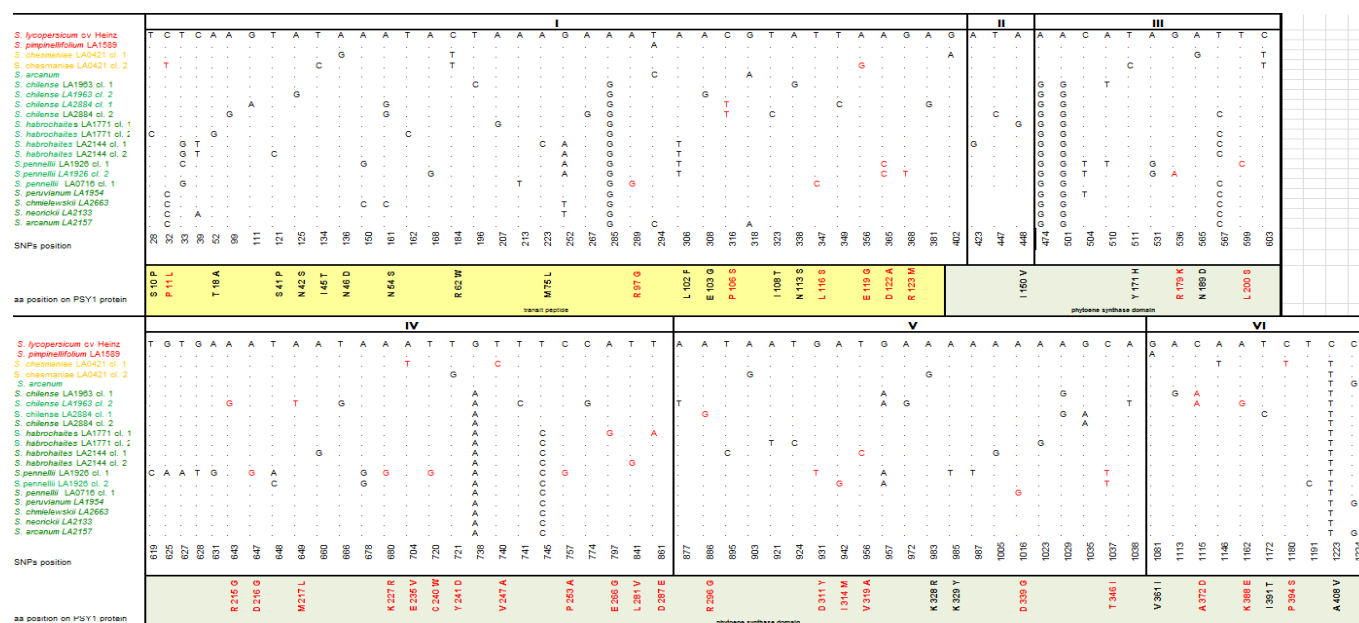


Рисунок 3 – Полиморфизм гомологов гена *PSY1* у видов томата. Цифры обозначают положение SNP в экзонах I–VI; аминокислотные замены показаны ниже. Несинонимичные SNP и радикальные аминокислотные замены отмечены чёрным и красным цветами.

В проанализированных гомологичных белках *PSY1* дикорастущих томатов в сравнении с белком SIPSY1 было обнаружено 56 аминокислотных замен, из которых 27 (58,7%), согласно предсказанию программы PROVEAN, были радикальными, однако, аминокислотных замен, сцепленных с окраской плода (красной, желтой, зеленой) выявлено не было (рис. 4). При этом детектированные мутации не были связаны с активными центрами, за исключением замены nD287E *S. habrochaites* LA1771 и rR296G *S. chilense* LA2884. Все гомологи *PSY1* содержали функционально важную мутацию Y136N, отсутствующую у видов *Capsicum* и других Пасленовых.

У анализируемых видов томата было выявлено 13 одинаковых консервативных мотивов в последовательности белков (программа MEME 7.0.26), что указывает на возможное сохранение каталитической функции гомологичных белков *PSY1* как у красноплодных, так и у зеленоплодных

видов томата и его низкая активность у зеленоплодных видов связана с регуляцией экспрессии гена, а не с его последовательностью.

<i>S. lycopersicum</i> cv Heinz	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. pimpinellifolium</i> LA1589	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chesmaniae</i> LA0421 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chesmaniae</i> LA0421 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chilense</i> LA1963 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chilense</i> LA1963 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chilense</i> LA2884 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chilense</i> LA2884 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. habrochaites</i> LA1771 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. habrochaites</i> LA1771 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. habrochaites</i> LA2144 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. habrochaites</i> LA2144 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. pennellii</i> LA1926 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. pennellii</i> LA1926 cl. 2	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. pennellii</i> LA0716 cl. 1	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. peruvianum</i> LA1954	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. chmielewskii</i> LA2663	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. neorickii</i> LA2133	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
<i>S. arcanum</i> LA2157	Y	A	K	T	F	N	Y	R	D	E	L	V	D	Y	A	V	G	S	G	N	Z	R	D	V	G	E	D	R	F	P	S	R	A	Y	V
aa position	131	132	133	134	135	136	154	158	161	162	163	164	165	239	244	247	248	251	276	279	286	287	288	289	290	291	296	354	355	359	381	382	383	384	

Рисунок 4 – Функционально важные сайты в белке *PSY1*. Активный центр выделен синим цветом, сайты связывания субстрата с Mg^{2+} — фиолетовым; дополнительные остатки, образующие активный центр выделены красным шрифтом; N136 (синий шрифт) - специфичная для видов томата замена Y136N.

Идентификация и характеристика варибельности гомологичных генов *PSY1* у 12 сортов томата, различающихся окраской спелого плода, позволила выявить 16 аллельных вариантов; некоторые сорта (Корнеевский, Zemba, Black Jack, NN25) были гетерозиготны. Проведенный сравнительный анализ показал, что окраска зрелого плода томата у образцов выборки может быть соотнесена с присутствием определенных аллельных вариантов *SIPSY1*. Так для красноплодных сортов были характерны аллельные варианты А, С, D, Е; для желтоплодных сортов- L, G; для сортов с темно-красной/бордовой окраской плодов – F, H, I, J, K, N, O.

Проведенный экспрессионный анализ гена *PSY1* в динамике развития плода показал, что у эволюционно более молодых видов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* (как красно-, так и желтоплодных сортов), ген *PSY1* экспрессировался в плодах в процессе созревания, с постоянно растущим уровнем от очень низкого на стадии IG до высокого на стадиях BR и RR (рис. 5). Аналогичная динамика наблюдалась у желтоплодного *S. cheesmaniae*, но уровень экспрессии *PSY1* был примерно в 5-7 раз ниже (рис. 5). У зеленоплодных видов уровень мРНК *PSY1* был минимален на всех стадиях созревания плода и сопоставим с листовым уровнем (рис. 5).

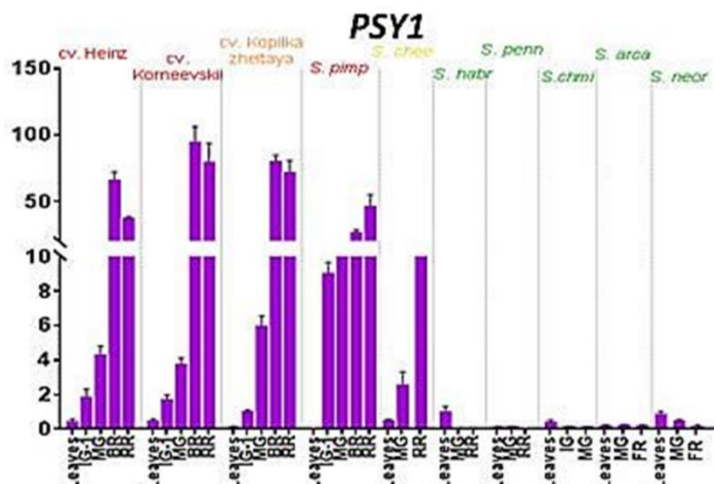


Рисунок 5 – Экспрессия *PSY1* в листьях (Leaves), в плоде (стадии IG-RR/FR) *S. lycopersicum* cv. Heinz, Корнеевский и Копилка желтая, *S. pimpinellifolium* VIR1018 (*S. pimp*), *S. cheesmaniae* (*S.chee*) LA0421, *S. habrochaites* (*S.habr*) LA2144 и *S. pennellii* (*S.penn*) LA0716, *S. chmielewskii* (*S. chmi*) LA2663, *S. arcanum* (*S. arca*) LA2157 и *S. neorickii* (*S. neor*).

Таким образом, содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется уровнем экспрессии *PSY1*, определяя количество бесцветных предшественников окрашенных каротиноидов, что подтверждает ранее полученные данные (Giorgio et al., 2008; Ezquerro et al., 2023). В целом, содержание каротиноидов в спелых плодах зависело от уровня экспрессии *PSY1*.

В связи с выявленными значительными различиями в экспрессии, впервые были выявлены и проанализированы регуляторные (промотор (~0.9 т.п.н.) и 5'-UTR (~1.5 т.п.н.)) последовательности генов-гомологов *PSY1* у красноплодного *S. lycopersicum* сорт Heinz и зеленоплодных видов *S. pennellii* (LA0716), *S. arcanum* (LA2157). Поиск сайтов, значимых для регуляции транскрипции *PSY1*, выявил 37 типов регуляторных элементов, связанных с тканеспецифической экспрессией и реакцией на фитогормоны и факторы стресса (рис. 6).

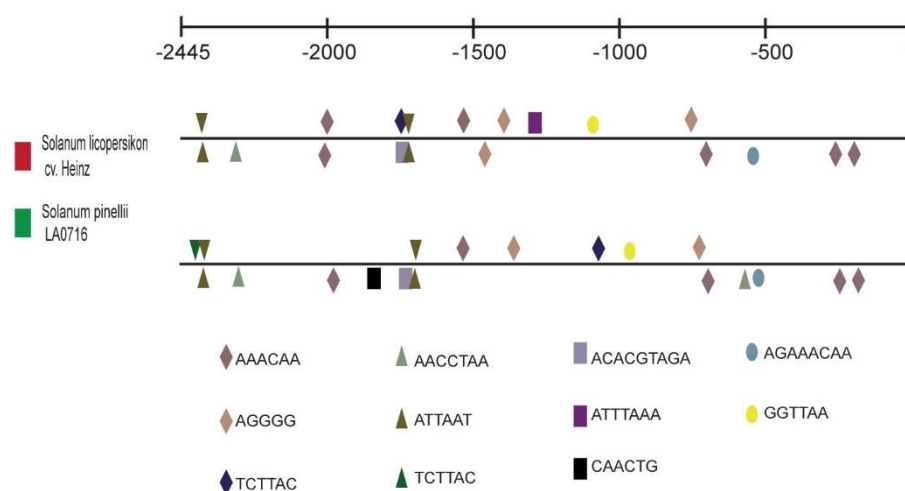


Рисунок 6 – Расположение регуляторных элементов в промоторе *PSY1* *S. lycopersicum* и *S. pennellii*.

Найденные различия в профиле *cis*-регуляторных элементов в промоторе и 5'-UTR *PSY1* красноплодного *S. lycopersicum* и зеленоплодных видов *S. pennellii* и *S. arcanum*, а также различия с соответствующими последовательностями у других видов указывают на то, что экспрессия гомологов *PSY1* может регулироваться разными механизмами (Wang et al. 2021). И, несмотря на выявленные различия в регуляторных областях красноплодного *S. lycopersicum* и зеленоплодных видов, общее расположение регуляторных элементов в промоторе и 5'-UTR *PSY1* у них сходные, что свидетельствует о значительной консервативности механизмов регуляции транскрипции *PSY1* у видов томата.

3. Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов 15-цис-зета(ζ)-каротинизомеразы *Z-ISO* в сортах и дикорастущих видах томата.

Ключевым этапом биосинтеза каротиноидов также является десатурация и *цис-транс*-изомеризация фитоина с образованием первого окрашенного каротиноида 9,9'-ди-*цис*-ζ-каротина. Данная реакция осуществляется 15-*цис*-зета(ζ)-каротинизомеразой *Z-ISO* (Chen et al. 2010). Несмотря на значимость данного белка, ранее последовательности гена *Z-ISO* для видов томата идентифицированы не были. В данной работе была получена 21 полная последовательность гомологичных генов *Z-ISO*, включая 5'-UTR и промоторные области тех же образцов томата, что и в случае *PSY1*, включающие девять дикорастущих видов и 12 сортов *S. lycopersicum*, различающихся по окраске плодов.

Размеры идентифицированных генов-гомологов *Z-ISO* варьировали от 3972 до 4010 п.н. из-за изменчивости интронов, тогда как кодирующие последовательности (кДНК) были одинаковы (1110 п.н.) и включали четыре экзона (рис. 7). Длина анализируемого регуляторного участка, включающая промотор и 5'-UTR, варьировала от 1716 п.н до 2182 п.н.

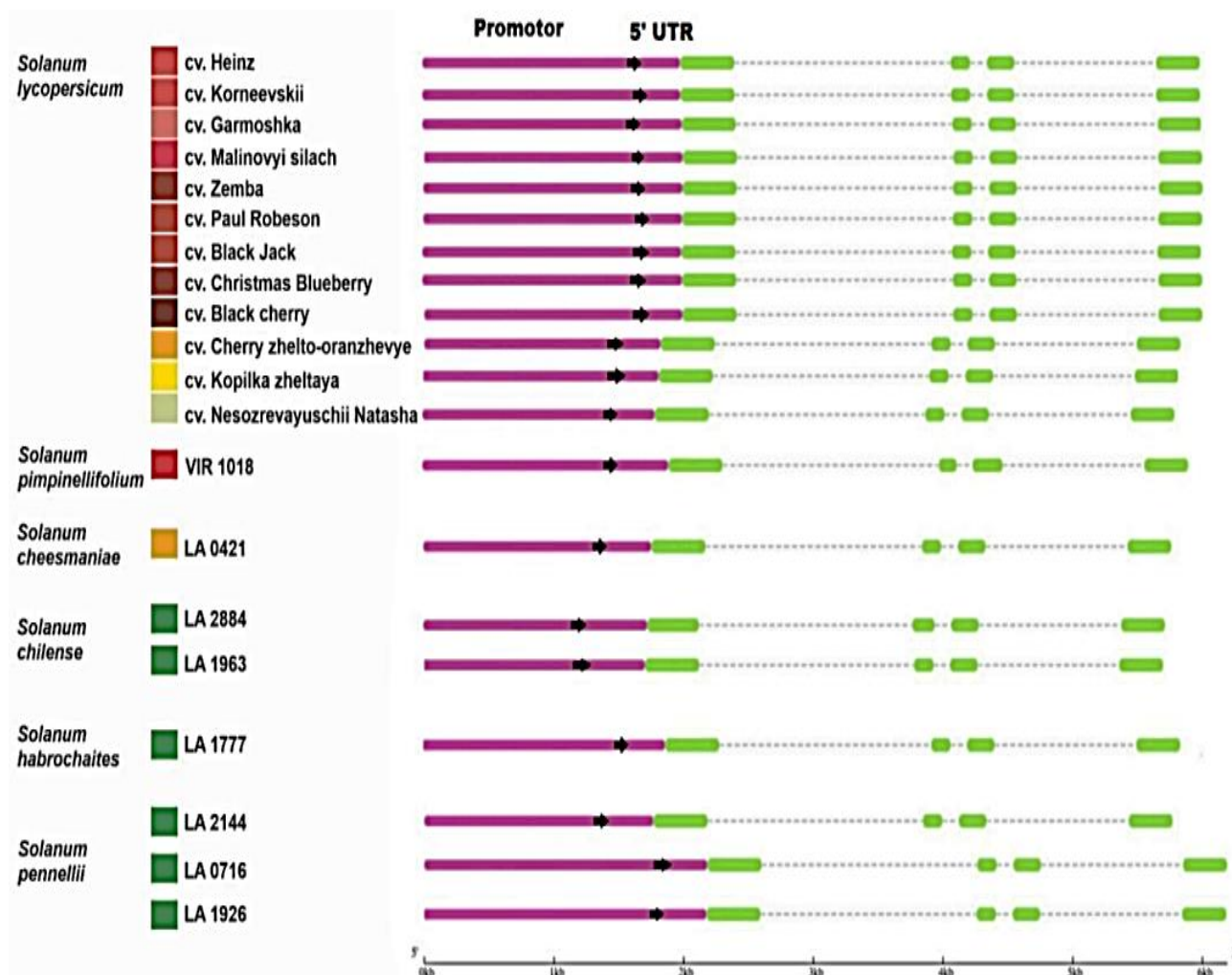


Рисунок 7 – Структура идентифицированных гомологичных генов *Z-ISO* у дикорастущих видов томата и сортов *S. lycopersicum*. В прямоугольниках указаны промоторы/5'-UTR (розовые) и экзоны (зеленые). Квадраты указывают на цвет спелого плода.

Согласно программе PROVEAN, 26 из выявленных 65 аминокислотных замен были предсказаны как радикальные и у дикорастущих видов в основном видоспецифичными. Однако, несмотря на замены, никаких специфических структур, которые бы отличали 3D структуру белка у зеленоплодных и красноплодных видов не выявлено.

Транскрипция гена *Z-ISO* в листьях у всех анализируемых видов (за исключением сорта Heinz) была низкой вне зависимости от цвета спелых плодов (рис. 8). У красно- и желтоплодных образцов экспрессия в плодах была следовой на стадиях IG и MG, и резко увеличивалась на стадии BR и RR. В плодах на стадии полной зрелости RR в сортах *S. lycopersicum* с красной и желтой окраской плода экспрессия *Z-ISO* была в 7–17 раз выше по сравнению с желто- и зеленоплодными видами. Экспрессия *Z-ISO* была крайне низкой у всех зеленоплодных видов (рис. 8).

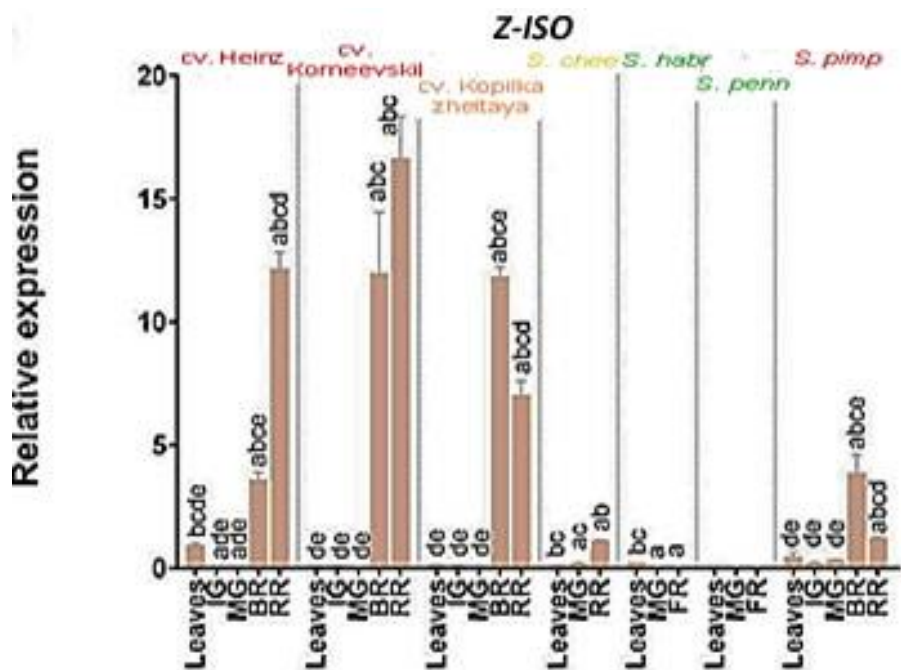


Рисунок 8 – Экспрессия *Z-ISO* в листьях и плодах видов томата (обозначения аналогичны рис. 5).

Были выявлены положительные взаимосвязи между содержанием общих каротиноидов и β -каротина в процессе созревания плода и уровнями транскрипции *Z-ISO*. Таким образом, содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется уровнем экспрессии *Z-ISO*.

В анализируемой регуляторной области генов *Z-ISO* был обнаружен 131 *cis*-регуляторный элемент, в том числе 18 свето-, 30 гормон- и 18 стресс-чувствительных элементов, а также сайтов связывания факторов транскрипции (рис. 9).

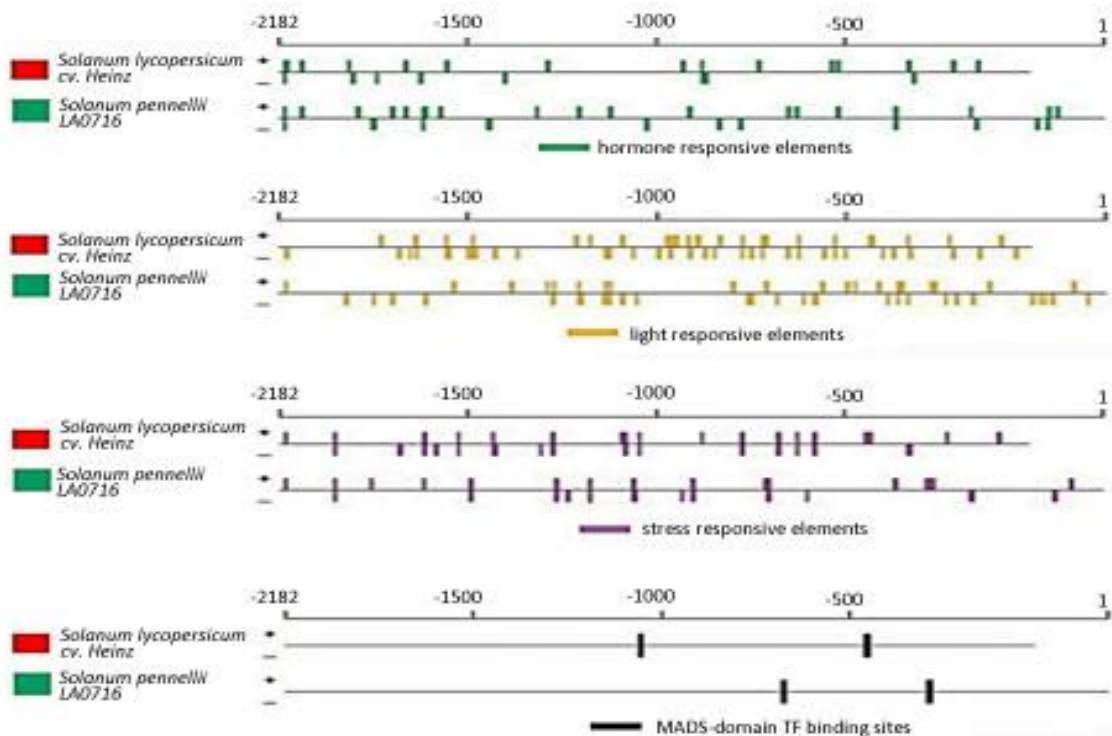


Рисунок 9 – Регуляторные элементы, идентифицированные в промоторе гена *Z-ISO* у *S. lycopersicum* сорта Heinz и *S. pennellii* (LA0716).

4. Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов каротин-*cis-trans*-изомераз *CrtISO* у сортов и дикорастущих видов томата.

Каротин-*cis-trans*-изомераза *CrtISO*, также считающаяся одним из основных ферментов каротиногенеза в плодах томата, катализирует реакцию *cis-trans*-изомеризации, с образованием *all-trans* ликопина, который является основным каротиноидом у красноплодных томатов и субстратом для образования α/β -каротинов и их производных (Isaacson et al. 2004; Yoo et al., 2017; Sun et al 2020). Белок имеет три изоформы, кодирующиеся генами *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*.

Были определены и охарактеризованы последовательности кДНК генов каротин-*cis-trans*-изомераз *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* у красноплодных видов *S. lycopersicum* (сорт Heinz), *S. pimpinellifolium* (LA0480) желтоплодного *S. cheesmaniae* (LA0421) и двух зеленоплодных видов (*S. habrochaites* (LA2144), *S. pennellii* (LA0716)).

Общий уровень межвидового полиморфизма кодирующих последовательностей был низок и составил 2.00%. Сравнение замен в составе кДНК последовательностей у пяти анализируемых видов выявило 39 (*CrtISO*), 31 (*CrtISO-L1*), 22 (*CrtISO-L2*) SNPs; индели отсутствовали (рис. 10).

CRTISO		23	90	111	120	122	159	203	237	244	247	251	252	258	408	600	613	636	666	687	720	821	919	963	997	1030	1051	1085	1101	1188	1200	1263	1269	1353	1428	1563	1781	1788	1819		
	<i>S. lycopersicum</i>	A	T	T	G	T	C	C	C	G	G	G	C	T	T	G	A	A	T	C	T	G	A	C	G	C	A	T	G	A	T	T	C	T	T	T	A	A	C		
	<i>S. pimpinellifolium</i>	A	T	T	G	G	C	C	C	G	G	G	C	C	T	T	G	A	A	T	C	T	G	A	C	G	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	A	A	C	
	<i>S. cheesmaniae</i>	T	T	T	G	G	A	C	C	G	G	C	T	A	T	T	A	A	C	C	T	G	G	A	G	C	T	T	G	A	T	A	T	C	C	A	A	A	C		
	<i>S. habrochaites</i>	T	C	C	C	G	C	C	C	A	C	G	C	C	T	C	A	G	G	C	C	A	G	A	C	G	A	A	T	A	A	A	T	C	C	C	A	G	A	C	
	<i>S. pennellii</i>	T	T	T	G	G	C	T	T	G	G	C	C	C	T	A	A	A	C	T	T	A	A	C	T	C	A	T	C	A	T	G	G	T	C	C	C	A	A	G	
		8YF			L40F	I41R		T68I			V82M	E83Q	S84T			I205V						R274Q	S307G		A333S	L344I	S351C	V362A			N400N	D421E						L607V			
CRTISO-L1		65	72	84	463	565	564	618	648	744	728	838	854	900	936	1190	1230	1218	1311	1339	1359	1410	1432	1440	1623	1715	1776	1806	1809	1854	1878	1977									
	<i>S. lycopersicum</i>	G	G	A	G	C	C	C	T	T	C	C	T	A	T	A	T	G	G	C	G	A	T	C	A	T	G	G	A	G	T										
	<i>S. pimpinellifolium</i>	G	G	A	A	G	C	C	T	T	C	C	T	T	T	A	T	G	A	C	C	G	T	T	A	T	G	G	A	G	T										
	<i>S. cheesmaniae</i>	G	G	A	A	G	C	C	T	T	C	C	T	T	T	A	T	C	G	C	G	T	T	A	T	G	G	A	G	T											
	<i>S. habrochaites</i>	A	T	A	A	T	C	T	C	C	A	T	T	T	T	A	T	C	G	T	C	G	C	T	T	G	A	G	A	G	A										
	<i>S. pennellii</i>	A	G	T	A	A	C	T	T	C	A	C	C	T	G	T	C	G	C	C	G	C	T	A	G	G	A	G	A	A											
		R22K		E28D	E155K						V276A	A285V			L397R				V445I				K478E		E572V	D592E															
CRTISO-L2		12	13	44	111	168	189	219	240	255	435	505	507	524	536	537	877	964	1181	1210	1377	1534	1730																		
	<i>S. lycopersicum</i>	G	G	A	G	A	A	C	T	T	C	C	A	A	G	T	A	T	C	T	C	C	G																		
	<i>S. pimpinellifolium</i>	G	T	A	G	A	A	C	T	T	C	C	A	A	G	T	G	T	C	T	C	C	A																		
	<i>S. cheesmaniae</i>	A	T	A	G	A	A	C	T	T	C	T	A	A	G	T	G	T	C	T	C	C	G																		
	<i>S. habrochaites</i>	A	T	A	A	G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	G	C	C	C	T	G																				
	<i>S. pennellii</i>	A	T	G	A	C	A	C	C	A	A	T	G	A	A	G	T	T	C	G	T	G																			
		V5F	N15S								Q169N	Q169H		K175R	R179Q		K293E	R394C		I459M	R512W	R577H																			

Рисунок 10 – Полиморфизм генов гомологов *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* у пяти видов томата; аминокислотные замены в белках показаны ниже.

Анализ консервативных мотивов с использованием программы MEME 7.0.26 позволил выявить в исследуемых ортологах *CrtISO* пяти видов томата 24 достоверных мотива (рис. 11). 13 мотивов были общими (мотивы 1-4, 6-12, 19 и 22) для всех гомологов *CrtISO*, а остальные были специфичны для *CrtISO* (5, 20, 21 и 24), *CrtISO-L1* (14, 15, 16) и *CrtISO-L2* (13, 17).

Проведенный экспрессионный анализ обнаружил транскрипты всех трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов видов томата. В плодах уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был крайне низок (кроме высокого уровня *CrtISO-L2* у красноплодных сортов *S. lycopersicum*) в сравнении с *CrtISO*. Эти данные согласуются с профилем экспрессии ортологичных генов у *Citrus*

В то же время более низкие уровни транскриптов *SINCED2* и пик активности данного гена на более ранних стадиях развития плода предполагает разделение функций NCED между двумя ферментами. Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *NCED1* и *NCED2* с содержанием β -каротина может свидетельствовать о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов *NCED*.

6. Экспрессия транскрипционного фактора *RIN* в динамике созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата.

MADS-доменный транскрипционный фактор *RIN* (SIMADS-*RIN*) является основным регулятором созревания плодов томатов, контролируя транскрипцию многочисленных генов, участвующих во всех стадиях процесса, включая ряд генов каротиногенеза (Fujisawa et al. 2012; Qin et al. 2012; Fujisawa et al. 2013).

Последовательность гена *RIN* была идентифицирована у двух красноплодных сортов *S. lycopersicum* (Heinz и Zemba) и у четырех зеленоплодных видов. Все проанализированные образцы видов томата имели одинаковую структуру гена *RIN*, который содержал восемь экзонов и семь интронов. Выявлено 390 SNPs (39 - в сортах, 351 - в образцах зеленоплодных видов). Структура *RIN* была сходной и у зеленоплодных видов не выявлено делеции в С-концевой области белка, характерной для зеленоплодного мутанта *rin* (Li et al., 2018). Следовательно, зелёная окраска плодов у видов *S. habrochaites*, *S. neorickii*, *S. pennellii* и *S. peruvianum* не связана с изменениями самого фактора *RIN*.

Анализ экспрессии показал, что хотя ген *RIN* экспрессировался на поздних стадиях созревания плода всех образцов, однако транскрипция у красноплодных образцов была высокая, в то время как у зеленоплодных она практически отсутствует или низка (рис. 14). Следовательно, наблюдается прямая связь между экспрессией регуляторного гена *RIN* и экспрессией его генов-мишеней.

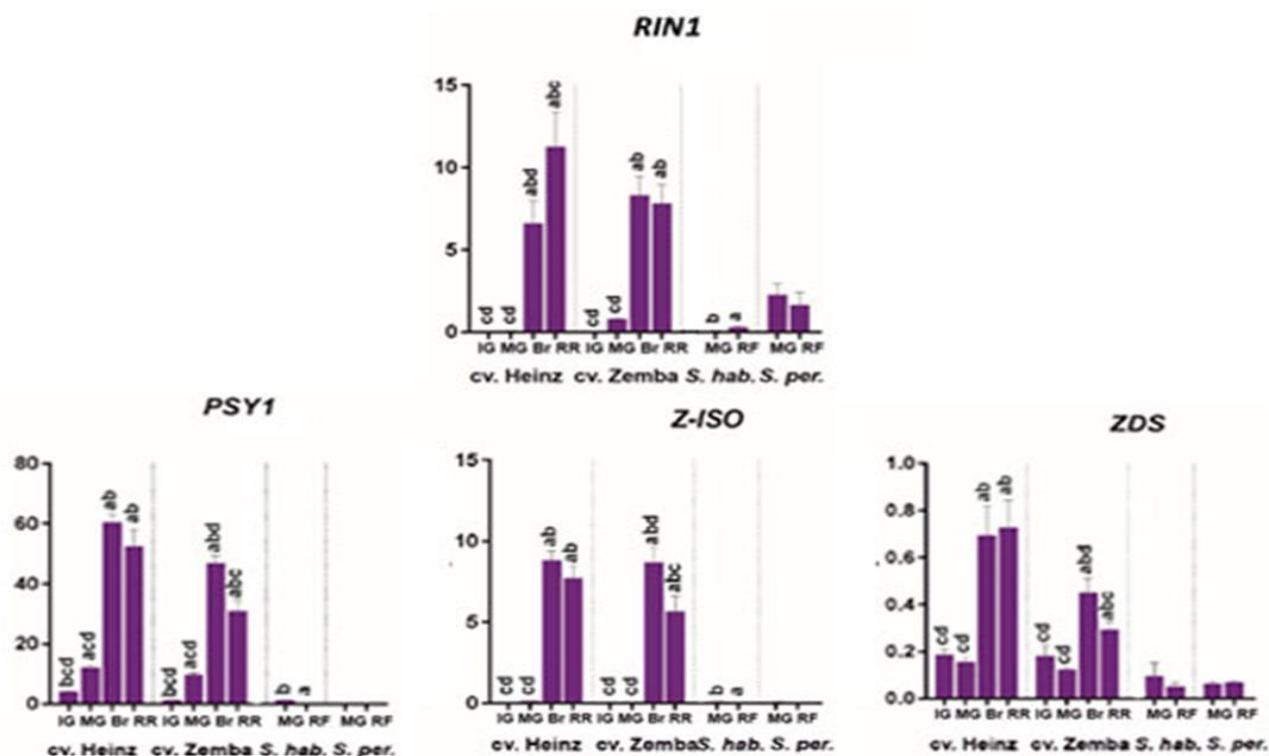


Рисунок 14 – Профиль экспрессии гена *RIN* и регулируемых им генов в плодах красноплодных сортов Heinz и Zemba, и зеленоплодных линий NN25 и видов *S. habrochaites* (*S. habr.*) и *S. peruvianum* (*S. per.*).

Также были проанализированы паттерны экспрессии предполагаемых генов биосинтеза каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO* и *ZDS*), которые ранее были определены как гены-мишени *RIN* (Qin et al., 2016). У всех анализируемых генов-мишеней ТФ *RIN* красноплодных видов происходит значительная активация транскрипции по мере созревания плода, особенно на последних стадиях BR и RR, в то время как у зеленоплодных видов для этих же генов наблюдается или минимальная экспрессия или ее отсутствие (рис. 15). Следовательно, наблюдается прямая связь между экспрессией регуляторного гена *RIN* и экспрессией его генов-мишеней. Проведенный анализ вариабельности показал, что последовательности и структура гена *RIN* у зеленоплодных видов и эволюционно более позднего красноплодного *S. lycopersicum* одинакова, и единичные аминокислотные замены несут незначительные последствия для функции регуляторного белка и активации ниже лежащих генов каротиногенеза. Проведенный в работе анализ первичных последовательностей ключевых генов каротиногенеза (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) также не выявил значимых изменений, которые могли бы существенно влиять на функции данных белков. Также не было выявлено значительных различий в регуляторных последовательностях этих генов и, главное, в количестве и расположении CArG-бок-сайтов связывания *RIN* в промоторах регулируемых генов биосинтеза каротиноидов. Основная разница заключалась в уровнях экспрессии анализируемых генов каротиногенеза в динамике созревания плодов. Так у эволюционно более древних зеленоплодных видов экспрессия этих генов в плодах либо отсутствовала (*PSY1*, *Z-ISO*), либо была на очень низком уровне (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*). В то время как у эволюционно более молодых красноплодных видов наблюдалась высокая экспрессия данных генов, особенно на поздних стадиях развития плодов (стадии BR и RR).

Обобщая полученные в работе биохимические и молекулярные данные можно предположить следующую схему регуляции каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата (рис. 15).

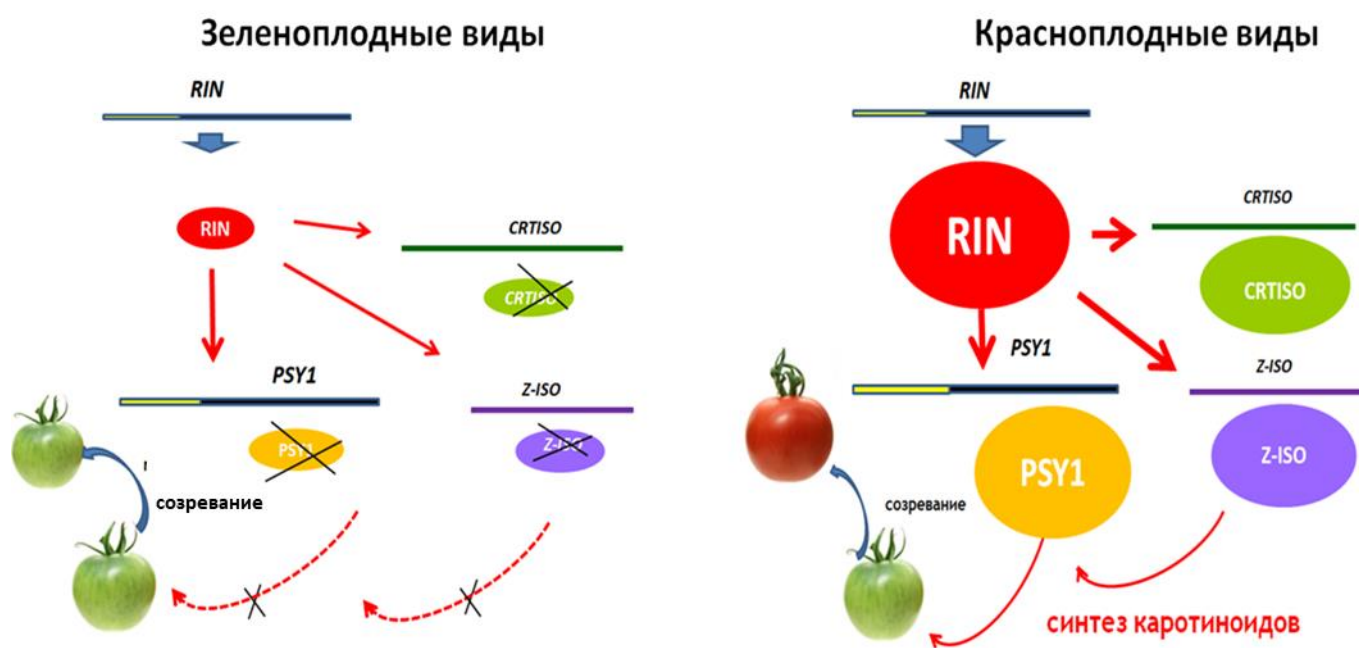


Рисунок 15 – Предполагаемая схема регуляции каротиногенеза у зелено- и красноплодных видов томата (крестиком обозначено отсутствие белка).

У зеленоплодных видов ген *RIN* практически не транскрибируется, либо транскрибируется на очень низком уровне. Белок *RIN* не синтезируется или синтезируется крайне мало. В связи с этим активации транскрипции нижестоящих генов каротиногенеза либо не происходит, либо она крайне низка, что не приводит к синтезу каротиноидов в плодах, и, как следствие, окраска плодов остается зеленой. В результате эволюции у красноплодных видов возникли изменения, приведшие к активации транскрипции гена *RIN* в плодах; увеличилось присутствие белка *RIN* на поздних стадиях созревания плода. ТФ *RIN* активирует транскрипцию генов каротиногенеза, стимулируя активный синтез каротиноидов, и плод краснеет (рис. 15). Таким образом, эволюционные преобразования, в том числе приведшие к активации экспрессии *RIN*, могли способствовать возникновению красноплодных видов.

ВЫВОДЫ

1. Качественный и количественный состав каротиноидов в листьях эволюционно более молодых красноплодных и желтоплодных видов и более древних зеленоплодных видов значимо не отличается, из чего следует, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях у видов томата.

2. Для красноплодных и зеленоплодных видов показана общая тенденция увеличения содержания каротиноидов в динамике развития и созревания плода от ранних стадий *IG* и *MG* к поздним стадиям *RR\FR* (небольшой рост у зеленоплодных и резкий у красноплодных видов).

3. Определены и охарактеризованы кодирующие и регуляторные последовательности ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *CRTISO-L1*, *CRTISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у образцов культивируемого вида *S. lycopersicum* и дикорастущих (красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных) видов томата секции *Lycopersicon*. Выявлены полиморфизмы в кодирующих последовательностях, а также изменения в наборе регуляторных элементов промотора, связанные с тканеспецифичной экспрессией и реакцией на фитогормоны и факторы стресса у красноплодных и зеленоплодных видов.

4. Проведен сравнительный межвидовой анализ профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *CRTISO-L1*, *CRTISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) в листьях, бутонах, цветках и плодах (2-4 стадии развития); показано, что:

- экспрессия *PSY1* растет по мере созревания плода от следового уровня (стадия *IG*) до высоких (*BR* и *RR\FR*). В сравнении с красноплодными *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* у желтоплодного *S. cheesmaniae* уровень экспрессии *PSY1* в спелом плоде в 5-7 раз ниже. У зеленоплодных видов уровень экспрессии *PSY1* низкий на всех стадиях созревания; в спелом плоде – в 65 раз ниже, чем у *S. lycopersicum*, и сопоставим с листовым уровнем.

- транскрипты *Z-ISO* обнаружены в листьях и плодах всех анализируемых видов. В процессе созревания плода экспрессия *Z-ISO* растет и прямо коррелирует с содержанием каротиноидов. В спелых плодах красно- и желтоплодных сортов *S. lycopersicum* экспрессия *Z-ISO* в 7–17 раз выше, чем у желтоплодного *S. cheesmaniae* и зеленоплодных видов; уровень экспрессии *Z-ISO* прямо коррелирует с содержанием каротиноидов.

- в сравнении с *CrtISO* уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* крайне низок, что подтверждает ключевую роль именно *CrtISO* в каротиногенезе, как в листьях, так и в плодах; для *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* предполагается участие в биосинтезе каротиноидов преимущественно в фотосинтезирующей ткани.

- профили экспрессии генов *NCED1* и *NCED2* предполагают разделение функции *NCED* между двумя ферментами, при этом ключевая роль в созревании плода принадлежит гену

NCED1, пик активности которого приходится на стадию смены окраски плода. Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *NCED1* и *NCED2* с содержанием β-каротина может свидетельствовать о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов *NCED*.

5. Показана консервативность последовательности гомологов транскрипционного фактора *RIN* у образцов красноплодных и зеленоплодных видов. При этом обнаружен высокий уровень экспрессии *RIN* в спелом плоде красноплодных видов и отсутствие\минимальная экспрессия у зеленоплодных видов. Выявлена прямая корреляция между уровнями экспрессии гена *RIN* и его генов-мишеней при созревании плода. Предложен возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов томата.

Список публикаций по теме диссертационной работы

1. **Efremov, G. I.** Differential regulation of phytoene synthase *PSY1* during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) / G. I. Efremov, M. A. Slugina, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva // *Plants*. – 2020. – Т. 9. – № 9. – С. 1-25.
2. **Efremov, G. I.** Characterization of 15-cis-ζ-carotene isomerase z-iso in cultivated and wild tomato species differing in ripe fruit pigmentation / G. I. Efremov, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva // *Plants*. – 2021. – Т. 10. – № 11.
3. Slugina, M.A.Characterization of *RIN* isoforms and their expression in tomato fruit ripening / M.A. Slugina, G.I. **Efremov**, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva // *Cells*.– 2021. – Т. 10. – № 7.
4. Филюшин, М. А. Вариабельность и экспрессия паралогов фитоинсинтазы (*PSY*) у видов перца клады *Annum* / М. А. Филюшин, Е. А. Дьяченко, Г. И. **Ефремов**, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова // *Генетика*. – 2021. – Т. 57. – №3. – С. 280-295.
5. **Ефремов, Г. И.** Влияние содержания каротиноидов и активности гена каротиноид-цис-транс-изомеразы *crtiso* на окраску плода томата / Г. И. Ефремов, Е. А. Джос, А. А. Ашихмин, Е. З. Кочиева, А.В. Щенникова // *Физиология Растений*. – 2022. – Т. 69. – №4. – С. 352-362.
6. **Ефремов, Г. И.** Сравнительная характеристика генов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназ *SLNCED1* и *SLNCED2* в процессе развития и созревания плода томата / Г. И. Ефремов, А. А. Ашихмин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева // *Физиология растений*. – 2023 г. – Т. 70. – №2. – С. 171-180.
7. **Ефремов, Г. И.** Функциональная диверсификация каротиноид-цис-транс-изомераз *CRTISO*, *CRTISO-L1* и *CRTISO-L2* у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) / Г. И. Ефремов, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева // *Доклады Академии Наук*. – 2023. – Т. 508. – №1. – С. 9-13.

Тезисы конференций

1. Слугина, М. А. Плоды томата: от эволюции промоторов к эволюции окраски / М. А. Слугина, Г. И. **Ефремов**, А. В. Щенникова, Е. А. Джос, Е. З. Кочиева // *Материалы конференции «125 Лет Прикладной ботаники в России»*. – Санкт-Петербург. – 2019. – С. 18.
2. **Ефремов, Г. И.** Аллельный полиморфизм гена фитоинсинтазы *SLPSY1* и биохимический анализ содержания ликопина и бета-каротина у современных сортов томата овощного (*Solanum lycopersicum*) / Г. И. Ефремов, Я. П. Тукусер, М. А. Слугина // *Материалы конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»*. – Москва. – 2019. – С. 101-102.
3. **Efremov, G. I.** Z-ISO: A catching up step towards formation of colored carotenoids in tomatoes / G. I. Efremov, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva // *Материалы VII международной научной конференции «PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS, AND BIOTECHNOLOGY» (PLANTGENE)*. – Новосибирск. – 2021. – С. 61.

4. **Efremov, G. I.** PSY1 governs the carotenoidbased pigmentation in yellow-to-red fruits of tomato species and cultivars / G. I. Efremov, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, M. A. Slugina // FEBS open bio.– 2021. – Т. 11. – №S1.
5. **Ефремов, Г. И.** Изменение окраски спелых плодов у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) как результат эволюции регуляторных последовательностей генов каротиноидного пути / Г. И. Ефремов, М. А. Слугина // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных. – Санкт-Петербург. – 2022. – С. 107.