

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ  
РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н. И. ВАВИЛОВА» (ВИР)

*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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Кочиева Е. З.

Санкт - Петербург  
2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Вторичные метаболиты и их значение у растений.....	10
1.2. Изопреноиды, как наиболее представительная группа вторичных метаболитов..	12
1.3. Каротиноиды. Структура, метаболизм и функции в растительной клетке.....	16
1.3.1. Строение каротиноидов.....	16
1.3.2. Функции каротиноидов.....	17
1.3.3. Биосинтез каротиноидов.....	20
1.3.4. Деградация каротиноидов.....	23
1.3.5. Локализация каротиноидов в растительной клетке.....	24
1.4. Содержание и состав каротиноидов в различных органах растений.....	25
1.4.1. Каротиноиды в зрелых сочных плодах.....	26
1.4.2. Содержание каротиноидов в цветках.....	34
1.4.3. Содержание каротиноидов в запасующих органах.....	35
1.5. Регуляция биосинтеза каротиноидов.....	38
1.5.1. Регуляция биосинтеза каротиноидов в фотосинтезирующих тканях.....	38
1.5.2. Регуляция биосинтеза каротиноидов в плодах.....	41
1.6. Таксономия и филогения видов томата <i>Solanum</i> секции <i>Lycopersicon</i> .....	45
1.7. Каротиногенез в плодах томата.....	47
1.7.1. Накопление каротиноидов в плодах разных видов томата.....	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
3.1. Биохимическая характеристика состава каротиноидов в листьях и плодах образцов дикорастущих и культивируемых видов томата.....	64
3.1.1. Сравнительное содержание общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в листьях.....	64
3.1.2. Сравнительное содержание общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в процессе созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата.....	65
3.1.3. Оценка содержания общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в сортах <i>S. lycopersicum</i> с различной окраской зрелого плода.....	68
3.2. Определение генов-гомологов фитоенсинтазы <i>PSY1</i> у сортов и видов <i>Solanum</i> секции <i>Lycopersicon</i> .....	70
3.2.1. Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных генов <i>PSY1</i> у сортов и видов <i>Solanum</i> секции <i>Lycopersicon</i> .....	71

3.2.2.	Структурный анализ гомологов фитоенсинтазы <i>PSY1</i> у сортов и видов томата .....	77
3.2.3.	Филогения видов томатов на основе <i>PSY1</i> .....	82
3.2.4.	Экспрессия <i>PSY1</i> в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции <i>Lycopersicon</i> .....	84
3.2.5.	Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) гена <i>PSY1</i> у красноплодного и зеленоплодных видов томата ....	88
3.3.	Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов 15-цис-зета( $\zeta$ )-каротинизомеразаы <i>Z-ISO</i> в сортах и дикорастущих видах томата .....	99
3.3.1.	Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных генов <i>Z-ISO</i> у образцов видов <i>Solanum</i> секции <i>Lycopersicon</i> .....	100
3.3.2.	Структурный анализ гомологов <i>Z-ISO</i> у сортов и видов томата секции <i>Lycopersicon</i> .....	106
3.3.3.	Экспрессия <i>Z-ISO</i> в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции <i>Lycopersicon</i> .....	108
3.3.4.	Анализ экспрессии <i>Z-ISO</i> у красно-, желто- и зеленоплодных видов томата....	109
3.3.5.	Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии <i>Z-ISO</i> .....	111
3.3.6.	Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) гена <i>Z-ISO</i> у красноплодного и зеленоплодных видов томата .	113
3.4.	Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов каротин- <i>cis-trans</i> -изомераза <i>CRTISO</i> в сортах и дикорастущих видах томата .....	117
3.4.1.	Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных генов <i>CRTISO</i> ( <i>CrtISO</i> , <i>CrtISO-L1</i> , <i>CrtISO-L2</i> ) у образцов томата .....	118
3.4.2.	Структурный анализ гомологичных генов <i>CRTISO</i> ( <i>CrtISO</i> , <i>CrtISO-L1</i> , <i>CrtISO-L2</i> ) у образцов томата .....	119
3.4.4.	Экспрессия гомологичных генов <i>CRTISO</i> ( <i>CrtISO</i> , <i>CrtISO-L1</i> , <i>CrtISO-L2</i> ) в различных органах и на различных стадиях созревания плода у образцов томата ....	121
3.4.5.	Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии гомологичных генов <i>CRTISO</i> ( <i>CrtISO</i> , <i>CrtISO-L1</i> , <i>CrtISO-L2</i> ) у образцов томата .....	125
3.3.6.	Идентификация мутаций <i>tangerine</i> 3183 и <i>tangerine</i> mic у желтоплодных образцов томата .....	125
3.5.	Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы <i>NCED</i> в сортах и дикорастущих видах томата .....	127

3.5.1	Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных <i>NCED1</i> и <i>NCED2</i> генов у образцов видов <i>Solanum</i> секции <i>Lycopersicon</i> .....	128
3.5.2.	Экспрессия <i>NCED1</i> и <i>NCED2</i> в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции <i>Lycopersicon</i> .....	132
3.5.3.	Анализ экспрессии <i>NCED1</i> и <i>NCED2</i> у красно-, желто- и зеленоплодных видов томата.....	133
3.5.4.	Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии <i>NCED1</i> и <i>NCED2</i> .....	134
3.5.5.	Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) <i>NCED1</i> и <i>NCED2</i> у красноплодного и зеленоплодных видов томата.....	136
3.6.	Экспрессия транскрипционного фактора <i>RIN</i> в динамике созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата.....	137
3.6.1.	Экспрессия <i>RIN</i> и его генов-мишеней в динамике созревания плодов у красноплодных сортов <i>S. lycopersicum</i> и дикорастущих зеленоплодных видов.....	140
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ и ВЫВОДЫ.....	144
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК - абсцизовая кислота

ТФ - транскрипционные факторы

АФК - активные формы кислорода

DXP (MEP) путь биосинтеза - глицеральдегидфосфатпируватный путь биосинтеза

MVA путь биосинтеза - ацетатно-мевалонатный путь биосинтеза

IPP- изопентенилдифосфат

DMAPP диметилаллилдифосфат

GPP- геранилпирофосфат

FPP- фарнезилпирофосфат

РЦ - реакционный центр

ССК1 и ССК2 - светособирающие комплексы фотосистем

GGPP- геранилгеранилдифосфат

DPA – день после цветения

IG-1 – растущий незрелый плод (DPA10-DPA20)

IG-2 - растущий незрелый плод (DPA20-DPA30)

MG - зеленый плод максимального размера

BR -переходный плод (изменение окраски плода с зеленой на красную)

RR (FR) - созревший плод

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Каротиноиды представляют собой одни из основных вторичных метаболитов, синтезируемые *de novo* во всех фотосинтезирующих организмах. Основная функция каротиноидов у растений связана с участием в фотосинтезе и фотозащите. Они играют важную роль в качестве светособирающих пигментов и структурных компонентов фотосистем. Также каротиноиды, являясь предшественниками биосинтеза фитогормонов абсцизовой кислоты и стриголактонов, участвуют в онтогенезе растения. Кроме того, производные каротиноидов могут действовать как сигнальные молекулы в ответ на изменения окружающей среды и фаз развития растения (Sun et al., 2022). Так недавние многочисленные 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). Также каротиноиды являются аттрактантами, придающими цветкам и плодам яркую окраску и запах, тем самым способствуя опылению и распространению семян (Serra, 2015; Maoka, 2020).

Каротиноиды критически важны для человека как антиоксиданты, супрессоры воспалительных процессов и онкогенеза (фитофлуен, фитоен, ликопин, ксантофиллы), источники провитамина А ( $\beta$ -каротин), который является регулятором экспрессии более 700 генов, а также основой глазного пигмента (лютеин/зеаксантин) (Eggersdorfer, Wyss, 2011; Mapelli-Brahm et al., 2021). Основными источниками каротиноидов в диете человека являются растения.

В связи с тем, что культивируемый красноплодный вид томата *S. lycopersicum* определен в качестве модельного объекта для изучения молекулярной генетики двудольных растений с сочными плодами (The Tomato Genome Consortium, 2012) и геном его сорта Heinz1706 секвенирован (GCA\_000188115.4), достаточно много известно о последовательностях и функциях генов данного вида, в том числе и генов каротиногенеза, их экспрессии в различных органах и тканях, а также в процессе созревания плода, в формировании ответа на стресс (Bramley, 2002; Su et al., 2015; Liu et al., 2015; Kilambi et al., 2017; Ezquerro et al., 2023 и др.). 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 (M82, Heinz 1706, Ailca Craig, MicroTom).

Род *Solanum* секция *Lycopersicon* включает 12 дикорастущих видов и культивируемый вид томата *S. lycopersicum*, образующие плоды, окраска которых изменяется в широких пределах и отражает качественный и количественный состав синтезируемых каротиноидов. 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)). При этом образцы дикорастущих видов томата как красноплодные, так и оранжево- и зеленоплодные, значительно различающиеся по составу/содержанию каротиноидов в плодах, используются в исследованиях либо достаточно редко (*S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*), либо практически никогда (*S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagense*, *S. neorickii*). Крайне мала информация о последовательностях генов биосинтеза каротиноидов у видов томата иных, чем у *S. lycopersicum*, об особенностях их экспрессии и регуляции.

У дикорастущих и культивируемого видов томата окраска зрелого плода, как результат качественного и количественного состава каротиноидов, представлена достаточно широким спектром, что делает данную группу хорошей модельной системой для изучения синтеза и накопления каротиноидов в плодах и их характеристика позволит прояснить особенности и эволюцию генов каротиногенеза у видов *Solanum* 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 каротиногена 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  $\beta$ -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 каротиногена 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 на 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, 2022), на VI и VII международных научных конференциях PlantGen (Новосибирск 2021, 2023), XX Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2020).

**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 источников).

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Вторичные метаболиты и их значение у растений

Вторичные метаболиты растений представляют собой многочисленные химические соединения, продуцируемые растительной клеткой посредством метаболических путей, происходящих от первичных метаболитов. К общим характеристикам вторичных метаболитов можно отнести относительно низкий молекулярный вес, биологическую активность, видоспецифичность и небольшое количество предшественников для синтеза (Böttger et al., 2018). Эти критерии не являются строгими, но, тем не менее, в целом, спектр вторичных метаболитов в растениях достаточно четко ограничен. Вторичные метаболиты используют для своего синтеза основные метаболические пути растений. Их биосинтез происходит в ветвях белкового, углеводного и липидного метаболических путей, где функционирует широкий спектр ферментов, определяющих способность растений синтезировать разнообразные метаболиты в результате дивергентной эволюции генов, кодирующих ферменты в их биосинтетических путях (Ashraf et al., 2018) (рис. 1.1).

Вторичные метаболиты являются важными соединениями, которые во многом определяют адаптивность растений к внешним воздействиям и опосредуют реакцию растений на неблагоприятные условия окружающей среды. Они также придают растениям цвет, вкус и запах. В настоящее время выделяют около 200 000 вторичных метаболитов растений (Verma, Shukla 2015; Thirumurugan et al., 2018). Содержание вторичных метаболитов (качественный и количественный состав) различаются у разных видов растений, при этом оно может различаться в пределах одного и того же вида растений или же у одного растения в процессе онтогенеза (Barton, 2007). Это связано с генетическими особенностями растения, с биотическими и абиотическими факторами окружающей среды, а также с количеством и доступностью веществ первичного метаболизма.

Некоторые вторичные метаболиты, такие как фенольные соединения, изопреноиды и фитогормоны, синтезируются и накапливаются у подавляющего большинства растений. К менее распространенным, но присутствующим у достаточно широкого круга видов, относятся некоторые гликозиды (амирин), растительные амины и беталаины (беталаин) (Böttger et al., 2018). Специфические метаболиты могут синтезироваться или у узкой группы видов (например, алкалоид никотин у *Nicotiana tabacum* и родственных видов табака), каротиноид капсорубин у перца *Capsicum annuum* и некоторых видов *Lycium*, или у только у одного вида (винбластин у *Catharanthus roseus*) (Hussein, El-Anssary 2019).

Вторичные метаболиты включают огромное количество различных по химической структуре и биологическим функциям веществ, в связи, с чем их классификация

достаточно тяжела. Существует несколько классификаций вторичных метаболитов, основанных либо на их химической структуре, либо биологических функциях (рис.1.1) (Böttger et al., 2018; Hussein, El-Anssary 2019).

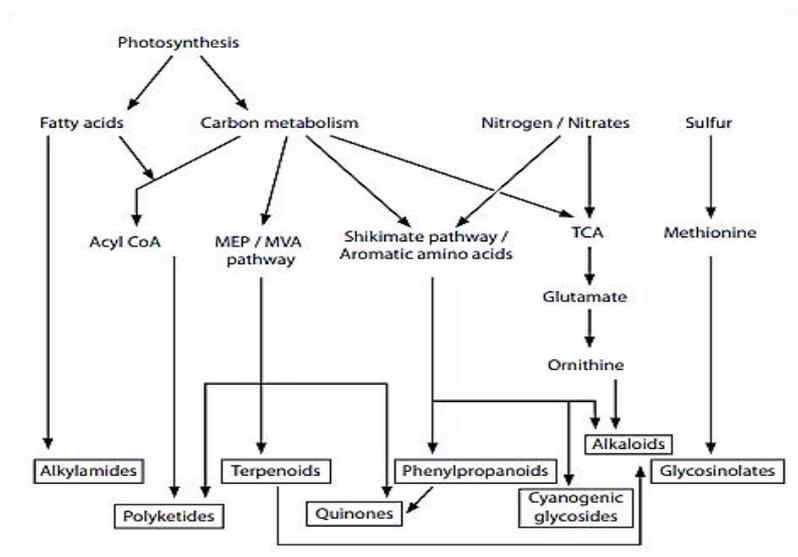


Рисунок 1.1 – Классификация вторичных метаболитов (Böttger et al., 2018).

Вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в различных частях клетки, тканях, органах растения. Синтез обычно проходит в цитозоле, эндоплазматическом ретикулуме и хлоропластах. Накопление вторичных метаболитов происходит в «метаболически неактивных» компартментах клетки — вакуолях, хромопластах и клеточной стенке (Bouvier et al., 2005).

Поскольку вторичные метаболиты считаются веществами с высокой биологической активностью и могут повреждать цитоплазму, то у растений существуют механизмы защиты такие как, например, упомянутое выше депонирование в отдельных компартментах, а также и химические модификации, такие как присоединение гидрокси- (–OH), эпокси- (–O–) и оксо- (=O) групп (Ладьгин, 2015; Meléndez-Martínez et al., 2019).

Различия в химической структуре разных классов вторичных метаболитов определяет и различия выполняемых функций. Основная функция вторичных метаболитов - это защита растительной клетки от биотического и абиотического стресса, и адаптация к окружающей среде (Fini et al., 2017; Ashraf et al., 2018; Jalil, Ansari 2020). Так фенольные соединения, алкалоиды, полиацетилены, тиофены и амины являются антибиотиками, противогрибковыми, противовирусными веществами, инсектицидами и, следовательно, способны защищать растения от различных классов фитопатогенов. Помимо защиты от биотического стресса, различные классы вторичных метаболитов также активно участвуют в адаптации растений к ионизирующему излучению, активным

формам кислорода, засухе, засолению и т.п. (Fini et al., 2017; Ashraf et al., 2018; Jalil, Ansari 2020). Так фенольные соединения и изопреноиды за счет особенностей своего химического строения являются одними из основных антиоксидантов клетки и участвуют окислительно-восстановительных реакциях, в том числе в фотосинтезе и дыхании (Meléndez-Martínez et al., 2019).

Помимо адаптационной, другая функция вторичных метаболитов – запасующая. Так алкалоиды, предшественниками которых являются аминокислоты, также могут участвовать в запасании клеткой азота и участвовать в его транспорте (Meléndez-Martínez et al., 2019). Аналогично гликозиды представляют собой форму хранения углеводов и их расщепление является одним из способов обеспечения растения углеводами в стрессовых условиях и при нехватке других углеводов (Meléndez-Martínez et al., 2019).

У цветковых растений крайне важная, хотя и эволюционно позднее приобретённая, функция вторичных метаболитов - способствование опылению и распространению семян. Вторичные метаболиты растений являются аттрактантами, придающие цветкам и плодам определенный цвет и вкус, обусловленный содержанием окрашенных пигментов (беталаины, антоцианы и каротиноиды) и ароматизаторов (эвгенол и геспертил) (Hadacek, 2002; Pandita, Pandita 2021; Kaur, Ahmed 2021).

## **1.2. Изопреноиды, как наиболее представительная группа вторичных метаболитов**

Изопреноиды или терпеноиды — это наиболее представительная (по разным источникам от 40000 до 80000 соединений), структурно и функционально разнообразная группа вторичных метаболитов растений (Tholl, 2015; Christianson, 2017).

Изопреноиды синтезируются из терпенов, которые модифицируются путем добавления или удаления метильных или кислородных групп. Общим строительным блоком всех изопреноидов является пятиуглеродное изопреновое звено ( $C_5H_8$ ) изопентенилдифосфат (IPP) и его аллельный изомер диметилаллилдифосфат (DMAPP). В результате конденсации пятиуглеродных IPP и DMAPP изопреновых звеньев образуются изопрен, а также предшественники для биосинтеза большого количества разнообразных как по строению, так и по выполняемым в растительной клетке функциям терпеноидных соединений, таких как пигменты (например, каротиноиды, хлорофилл), гормоны (например, цитокинины, гиббереллины, апокаротиноиды, включающие абсцизовую кислоту и стриголактоны), антиоксиданты (например, каротиноиды, пластохинон и убихинон), летучие вещества (Pollastri et al., 2021).

Количество пятиуглеродных изопреновых звеньев составляет основу классификации терпеноидов. В зависимости от количества звеньев можно выделить 8

групп изопереноидов, из которых одними из наиболее представительных у растений являются тертрагерпиноиды, к которым относятся каротиноиды (Ludwiczuk et al., 2017).

Наиболее значимой функцией изопреноидов является защита растительной клетки, прежде всего от окислительно-восстановительного стресса (Nowicka, Kruk 2010). Источником окислительного стресса могут быть различные абиотические факторы, такие как ионизирующее излучение, повышенные и пониженные температуры, засуха, засоленность и другие. Известно, что окислительный стресс связан в том числе с избыточным образованием активных форм кислорода (АФК) (Mittler, 2006). Было показано, что изопреноиды обладают способностью улавливать АФК благодаря наличию сопряженных двойных связей, обеспечивающих перенос электрона и энергии (Jalil, Ansari 2020). Способность изопреноидных молекул поглощать активные формы кислорода привела к гипотезе о антиоксидантной роли этих молекул. Предполагается, что механизмы, лежащие в основе защитных антистрессовых функций изопреновых соединений, в основном связаны с антиоксидантными свойствами, рассеиванием избыточной энергии, поглощаемой фотосинтетическими пигментами, стабилизацией тилакоидных мембран, а также с косвенными эффектами при передаче сигналов АФК (Sharkey et al., 2008; Pollastri et al., 2014). Было показано, что растения с высоким уровнем синтезом изопреноидов более устойчивы к биотическим и абиотическим стрессам, приводящим к синтезу АФК (Pollastri et al., 2021). Также на примере различных видов высших растений было однозначно показано, что изопреноиды (каротиноиды, убихинон и пластохинон) способны гасить озон, перекись водорода, синглетный кислород и оксиды азота (Affek, Yakir 2002; Jardine et al., 2014). Однако неясно, поглощают ли изопреноиды АФК в клетках мезофила или же в пограничном слое листа (Pollastri et al., 2021).

Помимо защиты от абиотического стресса, изопреноиды вовлечены в формирование резистентности к биотическим стрессам. Показано, что многие изопреноиды являются фитоалексинами и быстро вырабатываются растениями в ответ на контакт с бактериальными, вирусными и грибными патогенами. Для насекомых, травоядных животных растения — это источник пищи. В связи с этим, растения выработали множество систем химической защиты для борьбы с патогенами, травоядными насекомыми и животными (Ahuja et al., 2012). Некоторые изопреноиды обладают такими свойствами как горечь и токсичность. Действие изопреноидов как эффективных сдерживающих факторов зависит от восприимчивости их насекомыми и животными и обычно такого рода вещества обладают широким спектром действия.

Примером таких веществ может быть капсидол, который накапливается в табаке *N. tabacum* и перце чили *C. annuum* в ответ на грибковую инфекцию (Araceli et al., 2007).

Не менее важной функцией изопреноидов является структурная. Показано, что некоторые производные изопреноидов, такие как каротиноиды и фитостеролы, являются структурными компонентами мембран (Muñoz, Munne-Bosch 2019). Кроме того изопреноиды, например, каротиноиды, из-за липофильных свойств, играют важную роль в стабилизации мембран, улучшая степень гидрофобности тилакоидов за счет снижения проницаемости и разделения липидного слоя, защищая тем самым фотосинтетические комплексы (Sharkey et al., 2001).

Наряду с защитной и структурной, изопреноиды выполняют сигнальную функцию и являются регуляторами клеточного метаболизма. Некоторые сигнальные молекулы растений и фитогормоны имеют изопреноидное происхождение, являясь как непосредственно изопренами (гибберлины, цитокинины) или же их производными (абсцизовая кислота (АБК), брассиностероиды, стриглактоны) (Pollastri et al., 2021). Гиббереллины, являющиеся дитерпеноидами, стимулируют рост стебля, способствуют формированию плодов и семян, а также прорастанию семян, клубней и луковиц. Цитокинины стимулируют деление клеток, морфогенез побегов и корней; регулируют рост пазушных почек и верхушечное доминирование (Sakakibar, 2006; Hedden, Thomas 2012). Так АБК, производное каротиноида неоксантина, участвует в ростовых и метаболических процессах, способствует формированию и покою семян, клубней и корнеплодов, а также связана с устойчивостью к большому количеству абиотических стрессов (Zuo et al., 2019). Другие, недавно идентифицированные производные каротиноидов, стригалактоны, также являются сигнальными молекулами и ответственны за взаимодействие растений с симбиотическими бактериями и другими растениями (Meléndez-Martínez et al., 2019).

Еще одной функцией изопреноидов является их участие в аттракции насекомых-опылителей и в распространении семян растений. Некоторые изопреноиды, преимущественно монотерпиниды (например, линалол, мирцен, пинен) и сесквитерпеноиды (например, фарнезен, неролидол) являются летучими или полумлетучими низкомолекулярными соединениями, входят в состав эфирных масел и являются аттрактантами, обуславливая запах многих растений. Они могут специфичными для определенных семейств и видов растений или накапливаться в определенных органах и тканях (Meléndez-Martínez et al., 2019). Запах (летучие изопреноиды), а также окраска лепестков, прицветников и плодов (каротиноиды) привлекают животных, тем самым

способствуя опылению и распространению семян. Кроме того, они могут способствовать взаимодействию растений с опылителями (Tholl, 2015).

Существует два основных пути биосинтеза изопреноидов в растительных клетках - глицеральдегидфосфатпируватный путь биосинтеза (DXP или MEP) и ацетатно-мевалонатный путь (MVA) (рис.1.2) (Eisenreich et al., 2004; Nisar et al., 2015). Изопреноиды синтезируются из пятиуглеродных изопренов ( $C_5H_8$ ) изопентенилдифосфата IPP и его изомера диметилаллилдифосфата DMAPP и путем их конденсации пятиуглеродных единиц образуется геранилпирофосфат GPP, являющийся предшественником всех монотерпеноидов. Дальнейшее присоединение IPP приводят к образованию фарнезилпирофосфата FPP - предшественника сесквитерпеноидов, дитерпеноидов и сестерпеноидов (Pollastri et al., 2021) (рис.1.2).

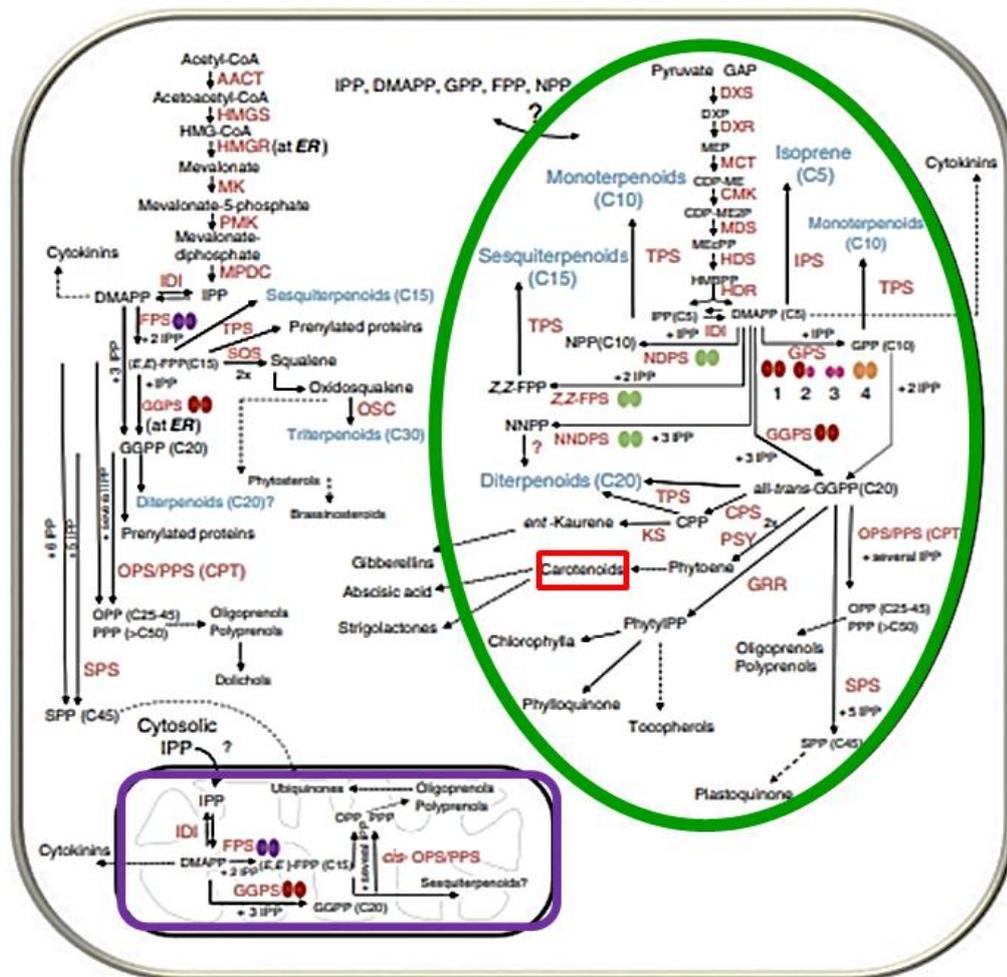


Рисунок 1.2 – Два пути биосинтеза изопреноидов. Глицеральдегидфосфатпируватный путь (DXP или MEP) и ацетатно-мевалонатный путь (MVA). Цветные овалы обозначают гомодимерный и гетеродимерный состав пренилтрансфераз, участвующих в биосинтезе терпеноидов. Овалы: определяют локализацию DXP или MEP пути в хлоропластах – зеленый и MVA путь- фиолетовый в строме и митохондриях (Pollastri et al., 2021).

Мевалонатный MVA путь, который осуществляется в цитозоле, начинается с конденсации двух молекулы ацетил-КоА. Ряд последовательных реакций приводит к синтезу изопентенилпирофосфата IPP и диметилаллилпирофосфата DMAPP. В пластидах биосинтез IPP и DMAPP осуществляется по так называемому немевалонатному MEP пути. Предшественниками являются пируват и D-глицеральдегид-3-фосфат. Пируват декарбоксилируется при участии тиаминпирофосфата (TPP) и конденсируется с D-глицеральдегид-3-фосфатом с последующим образованием DMAPP (рис. 1.2). Результатом биохимических превращений MVA и MEP пути, как уже сказано выше, стало образование IPP и DMAPP, которые и являются строительными блоками для разнообразных изопреноидных молекул, в том числе и каротиноидов (рис.1.2) (Rodríguez-Conceptión, Boronat 2002; Yuan et al., 2015).

### 1.3. Каротиноиды. Структура, метаболизм и функции в растительной клетке

#### 1.3.1. Строение каротиноидов

Каротиноиды относятся к группе тетратерпенов (C<sub>40</sub> изопреноидам) с сопряженными двойными связями и кольцами (одним или двумя) на концах молекул. Количество сопряженных двойных связей, определяющих антиоксидантные свойства каротиноидов, варьирует от трех (15-цис-фитоен) до одиннадцати ( $\beta$ -каротин,  $\beta$ -криптоксантин) (Rodríguez-Amaya, 2016). Каротиноиды представляют большую группу растительных пигментов, широко распространенных среди всех фотосинтезирующих организмов (растения, водоросли), а также среди некоторых нефотосинтезирующих бактерий и грибов (Соловченко 2001, 2011, 2013, 2015; Голубкина и др., 2010; Nisar et al., 2015; Yuan et al., 2015).

Каротиноиды делятся на каротины и ксантофиллы. Каротины – это углеводороды, содержащие только атомы углерода и водорода, например, 15-цис-фитоен,  $\zeta$ -каротин, ликопин. Ксантофиллы – это кислородсодержащие производные каротинов с атомами кислорода в виде гидрокси- (–OH) ( $\delta$ - и  $\alpha$ -каротины, криптоксантин, лютеин), эпокси- (–O–) ( $\gamma$ - и  $\beta$ -каротин, виолоксантин, зеаксантин) и оксо- (=O) (антероксантин, неоксантин) групп. По химическому строению каротиноиды могут быть алифатическими (ациклическими) (ликопин, 15-цис-фитоен), моно- ( $\gamma$ -,  $\delta$ -каротины) и бициклическими ( $\alpha$ -,  $\beta$ -каротины). В природе каротиноиды в основном представлены в транс-формах, но есть и цис-формы. Существуют стереоизомеры каротиноидов. например, лютеин и зеаксантин.

Каротины (гидроксикаротиноиды, такие, как лютеин, зеаксантин, криптоксантины) в зеленых листьях не этерифицированы, в то время как в плодах двудольных растений они обычно соединяются с жирными кислотами (Rodríguez-Amaya, 2016). Как и многие

растительные пигменты, каротиноиды способны образовывать агрегаты, обладающие определенными физико-химическими свойствами отличными от отдельных молекул. Также они формируют хромопротеиновые комплексы, участвующие в процессе фотосинтеза (Shumskaya, Wurtzel 2013).

Содержание каротиноидов определяется балансом биосинтеза и катаболизма. В отличие от биосинтеза, который осуществляется ферментами различных семейств, катаболизм определяется преимущественно ферментами семейства каротин-расщепляющих диоксигеназ CCD. В результате окисления каротиноидов диоксигеназами образуются различные продукты, такие как фитогормоны абсцизовая кислота, стриголактоны и изопреноидные летучие вещества, а также некоторые другие низкомолекулярные метаболиты (Huang et al., 2009; Navaux, 2014; Hou et al., 2016).

### 1.3.2. Функции каротиноидов

Каротиноиды в растительной клетке обладают разнообразными функциями. В основном они участвуют в фотосинтезе, являются антиоксидантами, участвуют в стабилизации мембран, а также обладают функцией аттракции животных для опыления и распространения семян.

*Светособирающая и структурная функции.* Каротиноиды участвуют в процессе фотосинтеза, так как они, во-первых, способны поглощать свет и переносить поглощенную энергию комплексу реакционных центров (РЦ) молекул хлорофилла, что особенно важно в сине-зеленой области спектра. Во-вторых, каротины ( $\beta$ -каротин и частично  $\alpha$ -каротин) принимают участие в организации и функционировании РЦ; ксантофиллы (лютеин, виолаксантин, антероксантин, зеаксантин, неоксантин) входят в состав светособирающих комплексов ССКI и ССКII хлорофиллов (Tracewell et al., 2001).

*Антиоксидантная и фотопротекторная функции.* Каротиноиды, как производные изопреноидов, характеризуются наличием сопряженных двойных связей, что позволяет им связывать активные формы кислорода и участвовать в окислительно-восстановительных реакциях (Mittler, 2006). Поглощая свет, молекула хлорофилла переходит в возбужденное, а затем в триплетное состояние. Образующийся возбужденный триплетный хлорофилл может активно взаимодействовать с молекулярным кислородом, переводя его в реакционно активное синглетное состояние (АФК). Каротиноиды способны гасить триплетный хлорофилл и таким образом предотвращать образование синглетного кислорода. Эта реакция тушения представляет собой реакцию триплет-триплетного обмена. Из триплетного состояния каротиноиды возвращаются в исходное синглетное, рассеивая энергию в виде тепла. Лучшими гасителями триплетного хлорофилла и

синглетного кислорода являются такие каротиноиды как виолоксантин, антероксантин, зеаксантин, образующиеся в виолоксантиновом цикле (Swapnil et al., 2021).

*Функция структурной стабилизации мембран.* Молекулы каротиноидов включаются в липидный бислой мембран так, что хромофор их располагается в гидрофобном ядре мембраны, а полярные группы располагаются с двух противоположных сторон мембранного бислоя за счет взаимодействия с гидрофильными группами молекул липидов (Gruszecki, Strzałka 2005). Включение каротиноидов существенно изменяют физические свойства липидного слоя, что приводит к укреплению структуры и стабилизации мембран, а также к изменению проницаемости для молекулярного кислорода, а также малых молекул и ионов. Так было показано, что  $\beta$ -каротин и, в частности, зеаксантин повышают проницаемость мембран для глюкозы (Gruszecki, Strzałka 2005). Ксантофиллы, входящие в липидные мембраны, повышают барьер проникновения молекулярного кислорода. Также было показано, что изменение состава каротиноидных пигментов в тилакоидных мембранах под действием активности ксантофиллового цикла или за счет включения экзогенных пигментов может приводить к изменению пластичности этих мембран. Таким образом, каротиноиды могут играть роль модуляторов физических свойств мембран (Gruszecki, Strzałka 2005).

*Функция аттракции животных для опыления и распространения семян.* Большая часть каротиноидов является окрашенными пигментами, что обуславливает яркую окраску плодов и цветов, которая привлекает животных, и тем самым способствуют опылению и распространению семян. Эта функция каротиноидов считается эволюционно более поздней для цветковых растений (Walter, Strack 2011). Возникновение ярко цвета у отдельных видов окрашенных плодов и цветков называют ароморфозом, что является результатом возникновения органоспецифичной экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в тканях генеративных органов растения. Так для ряда генов биосинтеза каротиноидов характерна дупликация генных последовательностей с последующей функциональной дивергенцией. Так например, ген *PSY*, который у низших растений и голосеменных представлен одной копией, у ряда цветковых дублирован/триплицирован с последующей диверсификацией функций, при котором один из генов экспрессируются преимущественно в плодах, как это было показано для гена *PSY1* томата, другой, *PSY2* - в листьях (Giorgio et al., 2008). Возникновение такого ароморфоза также возможно связано со специальным белком Orange, который непосредственно участвует в превращении хлоропластов в хромопласты и в накоплении каротиноидов (Yazdani et al., 2019).

Окраска цветов и плодов определяется содержанием ликопина,  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротинов и различных ксантофиллов, причем интенсивность окраски зависит от качественного и количественного состава каротиноидов. Ликопин, капсантин и капсорубин обуславливают красную окраску плодов; большинство ксантофиллов (лютеин, виолаксантин, антероксантин, зеаксантин, неоксантин и  $\beta$ -криптоксантин – определяют окраску от светло-желтой до тёмно-жёлтой/оранжевой (Голубкина и др., 2010; Lado et al., 2016). Наряду с ликопином,  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинами и ксантофиллами окраску растениям придают производные каротиноидов, например, цитраурин и биксин. Цитраурин способствует красной окраске плодов цитрусовых (Ma et al., 2013), а биксин является природным оранжевым красителем аннато *Bixa orellana* (Bouvier et al., 2003). Известно, что  $\beta$ -каротин – один из наиболее распространенных каротиноидов, с одиннадцатью сопряженными двойными связями имеет оранжевый цвет, а его изомер,  $\alpha$ -каротин - желтый цвет.  $\beta$ -каротин присутствует и определяет окраску корнеплодов моркови и батата, плодов тыквы, папайи, желтоплодных сортов томата и перца (Голубкина и др., 2010; Khoo et al., 2011; Lado et al., 2016). Наиболее часто встречающимися в плодах и цветках ксантофиллами (пигменты желто-оранжевого цвета) являются; лютеин и зеаксантин (желтые плоды томата и перца, кукуруза), Криптоксантины  $\alpha$ -криптоксантин и  $\beta$ -криптоксантин) представляют собой другие типы каротиноидов желто-оранжевого цвета и характерны для плодов папайи (*Carica papaya*), хурмы (*Diospyros* sp.), перцев (*Capsicum* sp.), кукурузы (*Zea mays*) (Голубкина и др., 2010; Khoo et al., 2011; Lado et al., 2016). Большое количество производных каротиноидов, представляют собой летучие ароматические соединения, которые могут придавать аромат цветам и плодам (Paparrella et al., 2021). Ряд летучих ароматических соединений, например,  $\alpha$ -ионон,  $\beta$ -ионон,  $\beta$ -циклоцитраль и  $\beta$ -дамасценон могут сильно влиять на аромат и вкус и тем самым способствовать привлечению опылителей и распространителей семян. Так, например,  $\beta$ -ионон и  $\beta$ -циклоцитраль, образующиеся из  $\beta$ -каротина под действием каротин-расщепляющих диоксигеназ CCD, присутствуют в плодах томата, арбуза и манго. В плодах томата и арбуза синтезируется гераниаль, псевдоионон и геранилацетон, являющиеся производными ликопина, и которые определяют вкус и запах плодов (Lewinsohn et al., 2005).  $\beta$ -ионон также был идентифицирован как один из основных летучих компонентов в плодах дыни, манго (Ibdah et al., 2006; Viuda-Martos et al., 2011). Также было показано, что  $\beta$ -ионон вносит вклад в формирование аромата цветов *Boronia megastigma*, *Petunia hybrida* и *Rosa damascene* (Cooper et al., 2003; Huang et al., 2009).  $\beta$ -дамасценон является одним из

наиболее распространенным природным производным каротина, который способствует ароматизации многих растений (Simkin, 2021).

### 1.3.3. Биосинтез каротиноидов

Каротиноиды синтезируются в результате реализации этапов МЕР пути биосинтеза изопреноидов в пластидах (рис.1.3). Путь биосинтеза каротиноидов начинается с конденсации двух молекул геранилгеранилдифосфата GGPP (C<sub>20</sub>) с образованием бесцветного каротиноида 15-цис-фитоена (рис.1.3). Эта реакция катализируется ферментом *фитоенсинтазой* (PSY; EC 2.5.1.32). Этот фермент катализирует первую реакцию биосинтеза каротиноидов, и его ингибирование подавляет синтез, и поэтому этот этап считается ключевым для дальнейшего биосинтеза каротиноидов (Chen et al., 2019). Фермент PSY высоко гомологичен у архей, бактерий и эукариот (Sandmann, 1994). У цветковых растений он имеет несколько изоформ (PSY1, PSY2, PSY3), кодирующихся гомологичными генами (Li et al., 2008; Fu et al., 2010; Rodríguez-Suárez et al., 2011; López-Emparán et al., 2014; Shao et al., 2018; Jang et al., 2019).

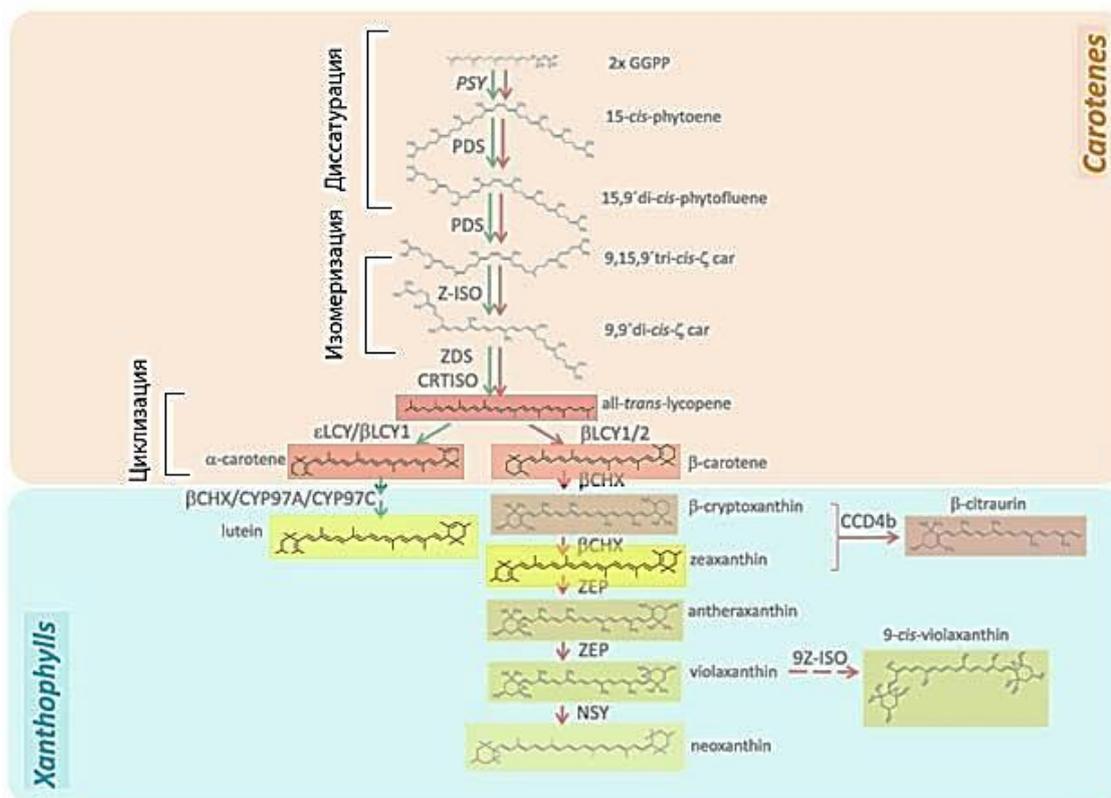


Рисунок 1.3 – Схема биосинтеза каротиноидов. Курсивом обозначены основные гены, кодирующие ферменты (Rodrigo et al., 2019).

На следующей стадии фермент *фитоендесатураза* (PDS; EC 1.14.99) вводит две двойные связи в 15-цис-фитоен с образованием бесцветного 9,15,-ди-цис-фитофлюена, содержащего 5 двойных связей, а потом 9,15,9'-три-цис-ζ-каротина с 7 двойными связями

(Koschmieder et al., 2017). Далее реакцию изомеризации образованием 9,9'-ди-цис- $\zeta$ -каротина выполняет фермент  $\zeta$ -каротин изомераза (Z-ISO; EC:5.2.1.12 ) (Beltrán et al., 2015) (рис.1.3).

Известно, что изопреновая цепь должна иметь, по крайней мере, семь сопряженных двойных связей для придания окраски пигменту (Armstrong, Hearst 1996). Это связано с тем, что сопряженные системы с меньшим количеством двойных связей поглощают энергию в ультрафиолетовой области электромагнитного спектра (ниже 390 нм). Поэтому и 15-цис-фитоен и 9,15,-ди-цис-фитофлюена (две и пять двойных связей соответственно) бесцветные каротиноиды. По мере увеличения числа сопряженных двойных связей в результате действия ферментов PDS и Z-ISO полиеновая цепь поглощает фотоны с большей длиной волны. Поэтому первым окрашенным каротиноидом, имеющий светло-жёлтую окраску, является 9,9'-ди-цис- $\zeta$ -каротин, содержащий семь двойных связей.

Следующую реакцию десатурации 9,9'-ди-цис- $\zeta$ -каротина выполняет фермент  $\zeta$ -каротин десатураза (ZDS; EC 1.14.99.30) и через образование промежуточного продукта 7, 9', 9',- три-цис-нейроспорина, содержащего 9 двойных связей, образуется 7, 9, 7', 9' тетра цис ликопин (проликопин) с одиннадцатью конъюгированными двойными связями (Araña-Garay et al., 2014) (рис.1.3).

На общем этапе синтеза всех каротиноидов *каротиноидизомераза* (CRTISO; EC:5.2.1.13) выполняет реакцию изомеризации с образованием ликопина (=all trans lycorene) (рис.1.3). Таким образом, с увеличением количества конъюгированных двойных связей с трех (15-цис-фитоена) до одиннадцати (ликопин), сдвигается абсорбционный максимум в сторону больших длин волн с 280-320 нм у 15-цис-фитоена до 450 нм у ликопина, что обуславливает красную окраску последнего (Liu et al., 2021).

Ликопин (all trans lycorene) является точкой ветвления биосинтеза каротиноидов (рис. 1.3). Существует две ветви пути.  $\beta$ ,  $\beta$ -ветвь и  $\beta$ ,  $\epsilon$ --ветвь, обусловленные образованием двух  $\beta$ -колец или  $\beta$ - и  $\epsilon$ -колец (рис.1.3). Для этого два фермента *ликопин  $\beta$ --циклаза* (LYCB; EC 5.5.1.19) и *ликопин  $\epsilon$ --циклаза* (LYCE; EC 5.5.1.18), используют ликопин как субстрат для синтеза  $\alpha$ -каротина и  $\beta$ -каротина с ионовыми кольцами на концах молекул, которые поглощают свет в диапазоне 440-460 нм, что обуславливает их желтую и оранжевую окраску (рис.1.3). Гидрокселирование каждого из ионовых колец  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротина приводит к образованию лютеина через зеиноксантин или зеаксантина через  $\beta$ --криптоксантин соответственно. Соответствующие реакции выполняют *гидроксилазы* (CYP97A3; EC 1.14.99.63 и CYP97C1; EC 1.14.14.158) (рис.1.3). Лютеин, зеаксантин имеют близкие максимумы поглощения 444 нм, что обуславливает их желтую окраску.

Лютеин представляет собой конечный ксантофилл *b*, *b*-ветви, а зеаксантин *b*,  $\epsilon$ -ветви может далее превратиться в виолаксантин (рис.1.3). Лютеин и зеаксантин отличаются количеством двойных связей: лютеин имеет десять сопряженных двойных связей, а зеаксантин содержит одиннадцать сопряженных двойных связей. Эпоксидация зеаксантина ферментом *зеаксантин-эпоксидазой* (ZEP; 1.14.15.21) приводит к образованию антероксантина (промежуточного соединения), и в последствии под действием фермента *виолоксантин-деэпоксидазы* (VDE; EC:1.23.5.1) к образованию виолоксантина. Эпоксидация зеаксантина и образование виолоксантина через антероксантин образует *ксантофилловый цикл* и оба фермента ZEP и VDE соответственно осуществляют прямую и обратную реакцию (рис.1.3). Прямая реакция деэпоксидации виолаксантина до зеаксантина идет на сильном свете, в то время как обратная реакция - на слабом свете или в темноте с использованием атмосферного кислорода (Liu et al., 2015).

На последней стадии *b*,  $\epsilon$ -ветви фермент *неоксантинсинтаза* (NSY; EC:5.3.99.9) приводит к образованию из виолоксантина неоксантина, – предшественника абсцизовой кислоты. Виолаксантин, антероксантин и неоксантин поглощают свет при длине волны 436-540 нм, что придает им оранжевую окраску (рис. 1.3).

Эпоксикаротиноиды составляют большую группу ксантофиллов растений, к которым относятся дигидроксиэпоксиды, производные зеаксантина, антероксантин ( $C_{40}H_{56}O_3$ , 10 конъюгированных двойных связей), виолаксантин ( $C_{40}H_{56}O_4$ , 9 сопряженных двойных связей), лютеоксантин ( $C_{40}H_{56}O_4$ , 8 двойных связей), ауроксантин ( $C_{40}H_{56}O_4$ , 7 сопряженных двойных связей) и неоксантин ( $C_{40}H_{56}O_4$ ). При этом происходит уменьшение количества двойных связей и обогащение молекул кислородом. Так антероксантин имеет одну эпоксидную группу, виолаксантин – две, лютеоксантин-три, а неоксантин содержит одну эпоксидную группу, а также три гидроксильные группы (Rodrigues-Amaya, 2016).

У видов перца (*Capsicum sp.*) существует специфическое отклонение от основного каротиноидного пути, характерного для подавляющего числа цветковых растений: зеаксантин, антероксантин и виолаксантин перца под действием *капсантин-капсорубинсинтазы* (CCS; EC; 5.3.99.8) превращаются в капсантин и капсорубин, придающий красную окраску плодам перца (Guzman et al., 2010; Jeknić et al., 2012).

Суммируя, можно сказать, что биосинтез каротиноидов с точки зрения химических реакций можно свести к нескольким последовательным стадиям: десатурации, циклизации и окислению (гидроксилирование, эпоксилирование, оксигенирование).

*Десатурация* (дегидрирование) фитоина до ликопина выражается в последовательном увеличении количества более ненасыщенных двойных связей (с 3 до 11) и обуславливает поглощение света в видимой части спектра при 350–550 нм. Процесс образования все большего числа ненасыщенных двойных связей в ходе последовательного дегидрирования формирует хромофор каротиноидов, что обуславливает сдвиг максимумов поглощения в длинноволновую часть спектра (Ладыгин, 2015). Процесс циклизации каротинов, начинается с образования  $\beta$ - и  $\epsilon$ -иононовых колец на концах молекул и синтезом  $\delta$ - и  $\gamma$ -каротинов. Реакции *гидроксирования*, *эпоксидирования* и *оксигенирования* сводятся к окислению и образованию гидрокси, оксо и эпокси групп, что возможно связано с необходимостью в дополнительной защите от фотосенсибилизированного окисления.

Таким образом, особенности химической структуры каротиноидов позволяют им быть сильными антиоксидантами и определяют их основные биологические функции, а возможность поглощать свет при преопределённой длине волны позволяют им быть окрашенными пигментами и определять окраску таких органов растения как, например, лепестки, плоды, клубни.

#### 1.3.4. Деградация каротиноидов

Расщепление каротиноидов происходит с помощью белков семейства *каротинреституирующих диоксигеназ CCD* (CCS; EC 5.3.99.8) и *9-цис-эпоксикаротиноид диоксигеназ NCED* (CCS; EC 5.3.99.8). Воздействие данных ферментов на соединения  $\beta$ -каротиноидного пути (рис. 1.3) приводят к образованию фитогормонов (абсцизовой кислоты, стриголактонов) и большого количества летучих соединений ( $\alpha$ -ионон,  $\beta$ -ионон,  $\beta$ -циклоцитраль и  $\beta$ -дамасценон). Деградация каротиноидов представляет собой один из способов регуляции биосинтеза каротиноидов (Nisar et al., 2015). Наиболее важными ферментами в деградации каротиноидов являются CCD1, CCD4, CCD7 и CCD8, которые приводят к потере пигментации и синтезу стриголактонов в растениях (например, у кукурузы, орхидей, персика, цитрусовых) (Ma et al., 2013; Rodrigo et al., 2013; Frusciante et al., 2014). Помимо CCD, неферментативное фотохимическое окисление осуществляется с помощью белков NCED. NCED ферменты могут расщеплять неоксантин с образованием абсцизовой кислоты (Nisar et al., 2015). Интересно отметить, что в отличие от пластидных CCD белков, NCED локализованы в цитозоле, что предполагает расщепление каротиноидов во внешних оболочках пластид (Frusciante et al., 2014). В дополнение к специфическим расщеплениям, опосредованным CCD и NCED, деградация каротиноидов также осуществляется неспецифическими ферментами, такими как липоксигеназы и

пероксидазы (Sun et al., 2020). Был показан значительный вклад неспецифического ферментативного и неферментативного окисления в деградацию каротиноидов и синтеза апокаротиноидов при созревании плодов и зерна (Koschmieder et al., 2017).

### 1.3.5. Локализация каротиноидов в растительной клетке

Основным местом биосинтеза, хранения и функционирования каротиноидов являются пластиды, преимущественно пластидные мембраны. Возможны две локализации каротиноидов в мембранах: либо пигменты непосредственно могут присутствовать в липидной фазе мембраны, либо входить в состав белково-пигментных комплексов. Наиболее яркий пример - распределение каротиноидов в тилакоидных мембранах фотосинтетического аппарата растительной клетки. Почти весь пул фотосинтетически активных каротиноидов (лютеина, виолаксантин и неоксантина) наряду с хлорофиллами a/b входят в состав белкового комплекса LHCP (light-harvesting pigment-protein complex of Photosystem II), основной функцией которого является улавливание квантов света и передача электронных возбуждений к реакционным центрам (Fuciman et al., 2012).

Сам биосинтез каротиноидов и ферменты каротиноидного пути расположены в строме или мембранах тилакоидов. Предполагается, что ферменты биосинтеза каротиноидов собраны в белковые комплексы, которые содержат последовательные группы ферментов (Shumskaya, Wurtzel 2013).

Определенное количество ксантофиллов (виолаксантин, антероксантин, зеаксантин) локализуется непосредственно в липидном слое тилакоидных мембран и такая локализация связана с работой ферментативного ксантофиллового цикла взаимопревращения между этими каротиноидами (Gruszecki, Strzalka 2005).

Как было ранее сказано, путь синтеза каротиноидов начинается с конденсацией двух молекул геранилгеранилдифосфата (GGPP) и образованием 15-цис-фитоена ферментом фитоенсинтазой PSY, который присутствует в строме пластид, при этом образуется гидрофильный комплекс, включающий помимо фермента как молекулы IPP, так и восемь молекул GGPS (рис.1.4). При этом остальные ферменты биосинтеза локалируются на мембранах тилакоидов или находятся в составе пластоглобул, которые содержат как ферменты, так и сами продукты синтеза - каротиноиды (Ytterberg et al., 2006; Joyard et al., 2009; Ruiz-Sola, Rodríguez-Concepción 2012; Shumskaya et al., 2012; Wang et al., 2013). Ранее было постулировано наличие трех мультибелковых комплексов, присутствующих в пластидных мембранах: (1) комплекс ферментов PDS с Z-ISO и ZDS с CRTISO (для синтеза ликопина из фитоена), (2) PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO и b-LCY (для

синтеза  $\beta$ -каротина из фитоена) и (3) b-LCY,  $\epsilon$ -LCY и гидроксилазы CYP97 (для синтеза лютеина из ликопина) (Cunningham and Gantt 1998) (рис.1.4).

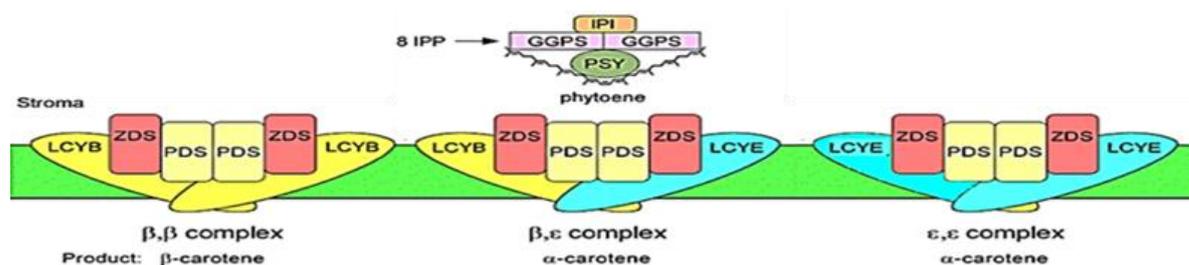


Рисунок 1.4 – Схема каротиногенных комплексов (по Cunningham, Gantt 1998).

Каротиноиды также могут накапливаться в различных органах и тканях, и пластиды разных типов обладают разной способностью накапливать каротиноиды. Специфическим и основным местом хранения разнообразных каротиноидов во многих растениях являются хромопласты, являющиеся эволюционно более молодыми структурами, которые могут образовываться из пропластид, хлоропластов и амилопластов (Swapnil et al., 2021). Накапливаясь в хромопластах, каротиноиды придают цветкам и плодам красную, желтую и оранжевую окраску, что обусловлено синтезом и накоплением ликопина, каротинов и ксантофиллов. Лютеин,  $\beta$ -каротин, виолаксантин и неоксантин также могут накапливаться в хлоропластах. Этиопласты накапливают в основном лютеин и виолаксантин (Park et al., 2002). Показано, что каротиноиды вместе с предшественником хлорофилла накапливаются в мембранных структурах проламеллярного тела (PLB) этиопластов, чтобы обеспечить переход в хлоропласты при освещении (Park et al., 2002). Кроме того, было показано, что различные ксантофиллы, такие как лютеин, зеаксантин и виолаксантин, способны к накоплению также в амилопластах (Swapnil et al., 2021).

#### 1.4. Содержание и состав каротиноидов в различных органах растений

Каротиноиды в различных органах растений могут накапливаться по-разному. Большое количество каротиноидов накапливается в плодах, а также корнеплодах и цветках некоторых видов. Кроме того, содержание каротиноидов в разных органах растения (лист, цветок, плод) зависит от стадии развития и условий окружающей среды.

*Содержание каротиноидов в листьях.* Как было упомянуто выше, роль каротиноидов в листьях велика. Каротиноиды участвуют в процессе фотосинтеза, в защите от активных форм кислорода и в окислительно-восстановительных реакциях (Mittler, 2006). Содержание их в листьях невелико и листья имеют постоянный качественный состав каротиноидов, который представлен лютеином (около 45%),  $\beta$ -

каротином (25–30%), виолаксантином (15%) и неоксантином (15%) (Affek, Yakir 2002). Содержание  $\beta$ -каротина и лютеина в листьях в среднем составляет 5,02 и 8,09 мг/100 г сырой массы. При этом у ряда видов в листьях обнаруживаются в незначительных концентрациях  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -криптоксантин, зеаксантин, антероксантин и лютеоксантин. Некоторые растения, чьи листья употребляются в пищу, такие как шпинат, кориандр, пажетник являются богатыми источниками каротиноидов. Максимальное содержание было детектировано у кайла *Brassica oleracea* var. *acephala*; содержание  $\beta$ -каротина в листьях кайла составляло 3.3- 4.8 мг /100г, а содержание лютеина было выше -4.2- 9.5мг/100 г. (Saini et al., 2015; Dias et al., 2021).

Регуляция биосинтеза каротиноидов в листьях известна. В условиях этиолирования основные факторы транскрипции (PIF) накапливаются в темноте и подавляют образование хлоропластов и биосинтез хлорофилла и каротиноидов путем прямого связывания с промотором, гена фитоенсиназы *PSY1/2*. Опосредованная светом деградация PIF депрессирует развитие хлоропластов и активирует экспрессию двух изоформ фитоенсиназы PSY1 и PSY2, таким образом, способствуя синтезу и накоплению каротиноидов вместе с хлорофиллами, чтобы облегчить переход к фотосинтетическому метаболизму (Galpaz et al., 2006; Kilambi et al., 2013). Ген *PSY2* специфичен, прежде всего, для хлоропластов и его экспрессия максимальна в фотосинтезирующей ткани. Он эволюционно возник ранее, чем *PSY1* (Tanksley, McCouch 1997; Galpaz et al., 2006; Chen et al., 2019). Экспрессия гена *PSY1* в листьях детектируется либо на том же уровне, либо на гораздо более низком уровне, чем в случае *PSY2* (например, в листьях кукурузы), либо практически не детектироваться (как в листьях томата) (Giorio et al., 2008).

Транскрипция генов биосинтеза каротиноидов резко меняется во время старения листьев. Было показано, что уровни экспрессии генов *LCYE*, *CYP97C1* и *CYP97A3* снижаются, что приводит к уменьшению биосинтеза через  $\alpha$ -ветвь каротинового пути. За этим следует активация генов  $\beta$ -каротингидроксилазы *BCH1*, которая может быть важна для последующего синтеза гормонов (Breeze et al., 2011).

#### 1.4.1. Каротиноиды в зрелых сочных плодах

Наибольшее количество каротиноидов накапливается в зрелых сочных плодах тех растений, чьи плоды имеют красную, желтую или оранжевую окраску. Так на ранних этапах формирования плода, качественный и количественный состав каротиноидов сходен с таковым у листьев и других фотосинтезирующих органов и представлен лютеином,  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинами, виолаксантином и неоксантином, и некоторыми второстепенными каротиноидами, такие как зеаксантин и антероксантин. По мере созревания плодов

происходят изменения в содержании и составе каротиноидов. Более того, качественный состав каротиноидов может также различаться в разных тканях плода, что предполагает различные механизмы регуляции биосинтеза и накопления каротиноидов в разных тканях плодов. Показано, что каротиноидный состав плодов может варьироваться в зависимости от сорта, климатических или географических условий, или условий выращивания (в случае теплиц), а также от условий хранения.

Сочные плоды, имеющие желтую, красную и оранжевую окраску зрелого плода в зависимости от содержания каротиноидов можно разделить на четыре группы: низко каротиноидные (содержание каротиноидов <1 мкг/г сырой массы), средне каротиноидные (1-5 мкг/г сырой массы), высоко каротиноидные (5-20 мкг/г сырой массы), очень высоко каротиноидные (более 20 мкг/г сырой массы). Данная классификация является общей и многие растения с различным качественным и количественным составом попадают в одну группу. В связи с этим в настоящее время было предложено разделить растения, образующие сочные плоды, на 8 групп, учитывая качественный и количественный состав каротиноидов (Lado et al., 2016).

Плоды I группы – незначительное содержание каротиноидов (например, плоды банана).

Плоды II группы – среднее содержание лютеина,  $\beta$ -каротина, виолаксантина и неоксантина (например, плоды киви, виноград и дыня).

Плоды группы III – высокое содержание ликопина, каротина и ациклических полиенов, таких как фитоен, фитофлуен (например, плоды арбуза, гуавы).

Плоды группы IV – высокое содержание  $\beta$ -каротина и его гидроксипроизводных -  $\beta$ -криптоксантина и зеаксантина (например, кожура плода кумкват).

Плоды группы V – высокое содержание эпоксикаротиноидов, виолаксантина, антраксантина или лютеоксантина (например, абрикос)

Плоды группы VI – содержание уникальных каротиноидов, например, капсантин и капсорубин (например, красный перец).

Плоды VII группы – содержание поли-цис-каротиноидов, проликопина (например, сорта томатов с мутацией *tangerine*).

Плоды VIII группы – содержание апокаротиноидов таких как  $\beta$ -цитраурин или 8-  $\beta$ -апокаротеналь (например, кожура зрелых мандаринов).

Чрезвычайное разнообразие содержания и состава каротиноидов в сочных плодах также коррелирует с различными моделями накопления каротиноидов в процессе их созревания (рис. 1.5).

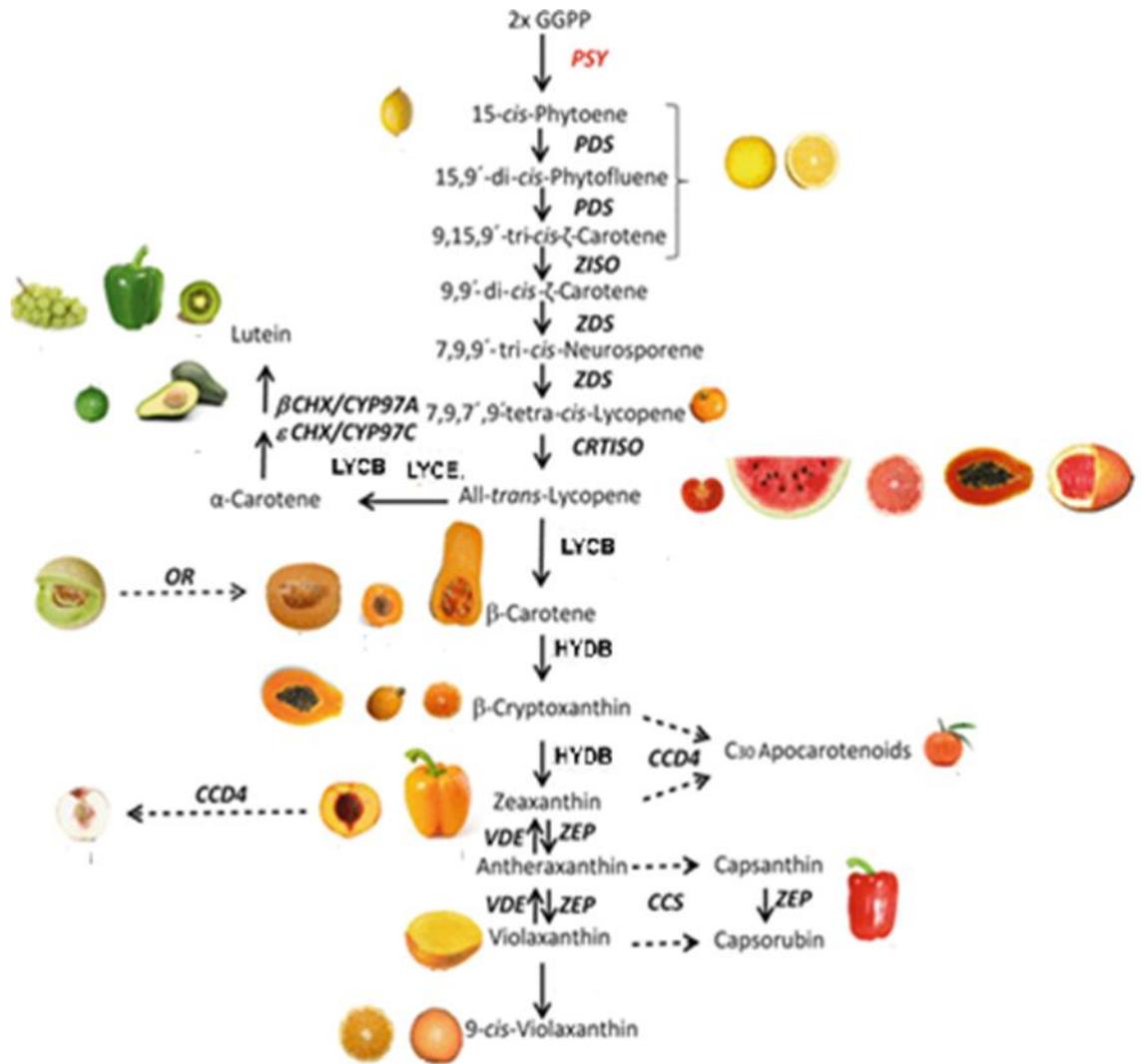


Рисунок 1.5 – Основные типы сочных плодов и состав каротиноидов, определяющих окраску плодов (Lado et al., 2016).

У растений с низким содержанием каротиноидов на начальных этапах роста плодов в процессе созревания уменьшается концентрация каротиноидов, однако сохраняется состав, который в основном представлен лютеином,  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинами, зеаксантином и криптоксантином, как это было показано для земляники (*Fragaria vesca*) и яблони (*M. domestica*) зависит от стадии развития и внешних условий (Lado et al., 2016). Самое низкое содержание каротиноидов у зрелых плодов с зеленой окраской и оно сопоставимо с содержанием в листьях и обычно не превышает 0,03 мг/г сырой массы (Islam et al., 2018). Было определено содержанием каротиноидов в плодах цуккини (*Cucurbita pepo* var. *cylindrica*) (Del Río-Celestino et al., 2012). Так в темно-зеленом эпикарпе и бледно зеленом мезокарпе плода цуккини содержание каротиноидов различалось: в эпикарпе их концентрация выше, чем в мезокарпе.

Основными каротиноидами мезокарпа являются лютеин и  $\beta$ -каротин. Наряду с лютеином и  $\beta$ -каротином в плодах также накапливались зеаксантин и  $\beta$ -криптоксантин,

однако их концентрации были незначительными. Показано, что светло-зеленые плоды цуккини характеризовались более низким уровнем каротиноидов (3.3 мкг/г лютеина и 4.5 мкг/г общих каротиноидов). У других сортов, имеющих интенсивную зеленую окраску эпикарпа, наблюдался средний уровень содержания общих каротиноидов (0,5 -1,4 мкг/г сырой массы в мезокарпе и от 37,4 - 87,0 мкг/г сырой массы в эпикарпе). Уровни экспрессии проанализированных генов биосинтеза каротиноидов, *CpGGPPS1*, *CpPSY1/2*, *CpZDS*, *CpPDS*, *CpCRTISO* и *CpLCYB1/2* были средними. При этом уровни экспрессии генов *CpCCD2* и *CpNCED4* были низкими, а экспрессия *CpNCED1/3*, и *CpZEP3* была относительно высока. Была показана активация генов первых этапов биосинтеза каротиноидов, в то время как нижележащие гены, включая *CpNCED1/3* и *CpCCD1*, подавлялись, что приводило к накоплению лютеина и других каротиноидов в плодах (Del Río-Celestino et al., 2012; Xu et al., 2021).

Различные сорта и виды киви (*Actinidia spp*) образуют плоды, окрашенные в зеленый и различные оттенки желтого. У зеленоплодных сортов и видов мякоть спелых плодов зеленая и, помимо хлорофилла, содержит лютеин и виолаксантин. Общее содержание каротиноидов в мякоти спелого плода достаточно низкое и составляет 0.7 мкг/г сырой массы (Амроман-Dwamena et al., 2009). В то время как у плодов, имеющих зелено-желтую и бледно желтую окраску мякоти плода, качественный и количественный составы каротиноидов несколько различаются: желтоплодные сорта киви накапливают больше  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинов, зеаксантина и  $\beta$ -криптоксантина, чем плоды с зеленой окраской мякоти, при этом общее содержание каротиноидов хоть и больше, чем у плодов с зеленой мякотью, но не намного (1.25-0.9 мкг/г сырой массы) (Амроман-Dwamena et al., 2009). Интересно и то, что у зеленоплодных киви по мере созревания плодов значительно увеличивается синтез хлорофилла, при том, что синтез каротиноидов растет незначительно (Амроман-Dwamena et al., 2018). Было показано, что у зеленоплодного киви *A. chinense* концентрация общих каротиноидов на первых двух начальных стадиях созревания составляет 0,63 мкг/г и 0,84 мкг/г. Концентрация  $\beta$ -каротина составляла до 40% от всех каротиноидов и было всегда выше, чем  $\alpha$ -каротина на всех стадиях созревания плодов и она повышалась в динамике созревания практически вдвое. Аналогичная тенденция наблюдалась для других видов киви *A. macrosperma* и *A. melanandra*, при этом в созревших плодах содержание  $\beta$ -каротина было еще выше и составило 70% от общего количества каротиноидов. Транскрипция *AcPDS* и *AcZDS* у анализируемых видов киви имела сходные паттерны, что позволяет предположить, что экспрессия этих двух генов может координировано регулироваться. Уровни транскриптов

*LCYB* у всех видов увеличивались с максимумом на стадии полного созревания. Примечательно, что *AcLCYB* сильно экспрессируется во время позднего развития плодов киви и была показана положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *AcLCYB* и накоплением  $\beta$ -каротина и лютеина, что указывает на важную роль его в накоплении каротиноидов во время развития плодов (Amromah-Dwamena et al., 2009).

Плоды с содержанием каротиноидов от низкого до умеренного, такие как, например, персик (*Prunus persica*) и абрикос (*Prunus armeniaca*), хурма (*Diospyrus kaki*) при созревании могут полностью поменять профиль каротиноидов. Наиболее распространенными каротиноидами в спелых плодах персика и абрикоса являются  $\beta$ -каротин и  $\beta$ -криптоксантин (рис.1.5). Другими обнаруженными каротиноидами были лютеинксантин, виолаксантин и неоксантин, но их концентрации были низкими и в целом их содержание снижались по мере созревания. Была показана прямая корреляция между окраской мякоти плода *P. persica* и содержанием как общих каротиноидов, так и отдельных пигментов. Биохимический анализ плодов персика показал, что в желтоплодных сортах концентрация  $\beta$ -каротина постепенно увеличивалась во время созревания и достигло максимальной концентрации 108 мкг/100 г свежего веса плода на стадии спелого плода. В то время как у сортов персика с белой мякотью  $\beta$ -каротин был обнаружен только в плодах на стадии зеленого плода с максимальной концентрацией 4 мкг/100 г сырой массы (Campbell, Padilla-Zakour 2013; Bianchi et al., 2015). Таким образом, у сортов персика с белой мякотью общее содержание каротиноидов, а также  $\beta$ -каротина и  $\beta$ -криптоксантина в 10 раз ниже, чем у сортов с желтой мякотью (Bianchi et al., 2015). Было показано, что такие различия в накоплении каротиноидов в плодах персика могут быть связаны с экспрессией генов биосинтеза каротиноидов. Большинство генов как в кожуре, так и в мякоти показали увеличение уровня транскрипции во время развития плодов. Достаточно неожиданно у сортов персика с белой мякотью транскрипция некоторых генов (*PpPSY*, *PpPDS*, *PpZDS* и *PpCCD4*) была несколько выше на начальных стадиях развития плодов, чем у желтоплодных. Уровни экспрессии *PpLCYB* и *PpCHYB* увеличивались по мере развития плодов в кожуре беломякотного персика и достигали пика на ранней стадии развития плода, после чего резко снижались. Известно, что у сортов с желтой мякотью экспрессия этих генов максимальный уровень транскрипции наблюдался на последних стадиях созревания (Bianchi et al., 2015; Lado et al., 2016).

Растения с более высоким уровнем содержания каротиноидов на начальных стадиях роста и развития плодов (например, томат, папайя, перец, арбуз, цитрусовые) в процессе созревания не только изменяют профиль каротиноидов, но и накапливают

больше  $\beta$ -криптоксантина,  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротина, ликопина и других каротиноидов и ксантофиллов (Lado et al., 2016).

Известно, что кожура и мякоть цитрусовых являются источником более 100 различных каротинов, ксантофиллов и их производных (Alquézar et al., 2009; Zhang et al., 2012). Накопление каротинов и ксантофиллов обуславливает большое разнообразие окраски плодов разных видов и сортов цитрусовых, от бледно желтой у лимона (*Citrus limon*) и помело (*Citrus maxima*) до ярко-оранжевой у мандарина (*Citrus reticulata*) и апельсина (*Citrus sinensis*). Во время развития плода цитрусовых происходит изменения в накоплении каротиноидов, сопровождающееся деградацией хлорофилла. На стадии зеленого плода у *C. sinensis*, *C. limon* преобладающими каротиноидами являются  $\beta$ -каротин (<8,4 мкг/г), виоксантин (<4,3 мкг/г),  $\alpha$ -каротин (<5,0 мкг/г) и лютеин (<14,8 мкг/г). Фитоен, фитофлуен,  $\beta$ -криптоксантин, зеаксантин практически не обнаруживаются. На следующей стадии концентрация  $\beta$ -каротина,  $\alpha$ -каротина и лютеина снижается или остается постоянной. При этом содержание  $\beta$ -,  $\beta$ -ксантофиллы ( $\beta$ -криптоксантина, зеаксантина и виолаксантина) возрастает до 50,7 мкг/г у *C. sinensis*, *C. limon*. Показано, что содержание каротиноидов в кожуре цитрусовых значительно выше, чем в мякоти (Matsumoto et al., 2007; Zhang et al., 2012; Ma et al., 2016). На начальных этапах созревания плода апельсина наблюдается накопление фитоена, обусловленное снижением уровня транскриптов *CitPDS*. В дальнейшем происходит снижение экспрессии *CitLCYe* и увеличение транскриптов *CitLCYb*. По мере созревания плодов мандарина и апельсина одновременно увеличивается экспрессия генов *CitPSY*, *CitPDS*, *CitZDS*, *CitLCYb*, *CitHYb* и *CitZEP*, что приводит к накоплению  $\beta$ -,  $\beta$ -ксантофиллов ( $\beta$ -криптоксантин, зеаксантин и виолаксантин) (Zhang et al., 2012). При этом экспрессия *CitCRTISO* остается низкой или снижается. Таким образом, накопление каротиноидов во время созревания цитрусовых в значительной степени регулируется именно координационной экспрессией большинства генов биосинтеза каротиноидов, а не какого-то одного (Kato et al., 2004; Zhang et al., 2012).

Было показано, что сайленсинг гена *CitCrtrB*, который участвует в превращении  $\beta$ -каротина в ксантофиллы, при экспрессии регуляторного гена *flowering locus*, ускоряющего цветение, приводит к увеличению содержания каротина более чем в 36 раз и снижению накопления нижележащих ксантофиллов, что приводит к образованию плодов желтой окраски (Stanley et al., 2019).

Плоды хурмы (*Diospyros kaki*) характеризуются высоким содержанием каротиноидов. Во время созревания плодов их общее содержание сначала снижается с 96,4 до 45,6 мкг/г сырой массы и затем увеличивается до 92 мкг/г сырой массы на стадии

средней спелости и может достигать максимальных значений 310 мкг/г сырой массы в полностью созревшем плоде (Ebert, Gross 1985). Показано, что по мере созревания плода повышается экспрессия всех основных генов каротиногенеза с максимумом на стадии созревшего плода (исключение – ген ликопинциклазы *DkLCY*, экспрессия которого падает). При этом ключевым является резкое повышение транскрипции гена фитоенсинтазы *DkPSY* на поздних стадиях созревания (Zhao et al., 2011). Анализ пигментов у желтоплодных и красноплодных сортов хурмы показал, что преобладающими пигментами являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротин, а также  $\beta$ -криптоксантин и зеаксантин (Кароог et al., 2022). Экспрессионный анализ 12 структурных генов каротиноидов у этих сортов в динамике развития и сравнение с метаболомными данными показал, что именно высокая экспрессия генов *DkPSY* и *DkZDS* и низкая экспрессия гена *DkLCYE* вызвали разницу в накоплении ликопина между двумя сортами (Zhao et al., 2011).

Большинство плодов культивируемых видов Тыквенных (род *Cucurbita*) также характеризуются высоким содержанием каротиноидов в зрелом плоде. Цвет мякоти *Cucurbita pepo* (кабачок) обычно белый или бледно-желтый, в то время мускатная тыква *Cucurbita moschata* и тыква крупноплодная *Cucurbita maxima* имеет желтую и оранжевую окраску цвета мякоти и для которых показано наибольшее содержание каротиноидов (Xu et al., 2021). Особенностью мускатной и крупноплодной тыквы является то, что в мякоти многих сортов накапливается  $\alpha$ -каротин. Было показано, что среднее содержание общих каротиноидов в *C. moschata* изменяется в диапазоне 234,21 мкг/г.- 404,98 мкг/г сырой массы. При этом для большинства сортов характерно линейное увеличение содержания каротиноидов по мере созревания плода (Bonina-Noseworthy et al., 2016). Показано, что ключевыми генами оказывающие основное влияние образование желтой мякоти у сортов и видов рода *Cucurbita* и, в частности, у тыквы обыкновенной (*C. pepo* var. *pepo*) являются *CpPSY* и *CpCHYb* (Xu et al., 2021). Высокая экспрессия гена *CpCCD4* катаболизма каротиноидов связана с образованием плодов тыквы с белой мякотью (Xu et al., 2021). Также было показано, что повышенная экспрессия *CmPSY* и *CmCHYb* влияет на образование плодов *C. maxima* и *C. moschata* с желтой мякотью, а различия в накоплении лютеина и  $\beta$ -каротина связано с дифференциальной экспрессией генов *CmPSY* и *CmLCY-e* (Xu et al., 2021).

Шиповник (*Rosa rugosa*, *R. conina*), плоды которого, как и плоды тыквы характеризуется как высоким содержанием каротиноидов, так и присутствием  $\alpha$ -каротина и лютеина. Было показано, что содержание общих каротиноидов в мякоти плодов шиповника составляет 200 мг/г сухой массы. При этом у разных видов шиповника (*Rosa*

*spp*) выявлен разный качественный и количественный состав. Так плоды шиповника *R. rugosa* содержат виолаксантин и газаниаксантин а также больше  $\beta$ -криптоксантина, в то время как плоды *R. canina* содержат больше  $\alpha$ -криптоксантина (Javanmard et al., 2018).

Зрелые плоды перцев (*Capsicum spp*) характеризуются высоким и при этом разнообразным качественным и количественным составом каротиноидов и, как следствие, могут иметь желтую, оранжевую и красную окраску мякоти и кожицы. Как правило, плоды темно-красного цвета содержат самое высокое общее количество каротиноидов по сравнению с плодами более светлого цвета. Количество каротиноидов у красноплодных образцов перца в 4-5 раз выше, чем в зеленоплодных. Как и у большинства других сочных плодов, каротиноиды синтезируются и накапливаются по мере созревания. На первых стадиях развития плод имеет зеленую окраску, и пигменты представлены 68% хлорофиллами а/б и 32% каротиноидами (Ha et al., 2007; Lado et al., 2016). На этой стадии типичными каротиноидами являются лютеин, виолаксантин, неоксантин и  $\beta$ -каротин. По мере созревания плода хлоропласты дифференцируются в хромопласты, содержащие различные каротиноиды, которые в совокупности способствуют различной окраске плодов от зеленого до коричневого, а затем до желтого, оранжевого, красного и/или темно-красного на стадии окончательной зрелости, в зависимости от сорта или вида (Meléndez-Martínez et al., 2010). К основным каротиноидам *C. annuum* относятся капсантин, капсорубин,  $\beta$ -каротин, зеаксантин, виолаксантин, лютеин и антероксантин, концентрация которых различается на разных стадиях зрелости плодов. Основными каротиноидами *C. pubescens* *C. baccatum* являются капсантин, антероксантин, мутатоксантин, виолаксантин,  $\beta$ -каротин и капсантин-5,6-эпоксид.  $\beta$ -каротин и лютеин являются основными каротиноидами желтоплодных сортов. В плодах оранжевых сортов *C. annuum* также присутствует зеаксантин, содержание, которого по мере созревания изменяется значительно в диапазоне от 85 до 151 мг/100 г сухого веса (Moscone et al., 2007; Lado et al., 2016; Jang et al., 2019).

Виды перца интересны также и тем, что у них основными красными каротиноидами являются не ликопин, как в случае томата и арбуза, а специфические пигменты - капсантин и капсорубин, которые являются преобладающими красными ксантофиллами, определяющими красную окраску плодов. Это основной красный пигмент, на долю которого приходится почти 80% всех каротиноидов, содержание которого у разных видов варьирует от 230 до 848 мкг/100 г сырой массы. Капсантин и капсорубин обнаруживается только на стадии полной зрелости плодов *C. annuum* в концентрациях 3,86 и 3,17 мг/100 г сухой массы соответственно (Ha et al., 2007). Уровень

капсантина при созревании значительно повышается. Биосинтез капсантина и капсорубина катализируется капсантин-капсорубинсинтазой (CCS) из их 5,6-эпоксикаротиноидных предшественников, антероксантина и виолаксантина соответственно. CCS экспрессируется на поздних стадиях созревания плода. Показано, что уровни экспрессии генов *CaCCS* коррелируют с накоплением каротиноидов (Ha et al., 2007).

#### 1.4.2. Содержание каротиноидов в цветках

Биосинтез каротиноидов в цветках, и как следствие, их окраска, эволюционно прежде всего, связана с привлечением опылителей. В цветках каротиноиды обнаруживаются во всех анатомических частях: чашелистиках, тычинках (пыльце, пыльниках) и лепестках. Цветки накапливают разный набор каротиноидов, состав которых зависит от вида и сорта, при этом различия у одного и того же вида могут быть связаны с сортовыми особенностями, условиями выращивания и другими факторами. Наибольшее количество каротиноидов содержится в окрашенных лепестках и тычинках. Большинство изученных к настоящему времени цветков различных растений в первую очередь содержат лютеин,  $\beta$ -каротин,  $\beta$ -криптоксантин и зеаксантин, определяющие окраску лепестков венчика и тычинок в различные оттенки желтого и оранжевого. При этом содержание каротиноидов в цветках некоторых растений может превышать содержание каротиноидов в сочных плодах культивируемых овощных культур: так в цветках календулы (*Calendula arvensis*) синтезируется 1062 мкг/г сырой массы лютеина, у настурции садовой (*Tropaeolum majus*) - 350–450 мкг/г сырой массы.

В тычинках обнаруживался фитоен, лютеин,  $\beta$ -криптоксантин и различные изомеры зеаксантина; некоторые каротиноиды этерифицированы. Наибольшее содержание каротиноидов в тычинках было показано для шафрана *Crocus sativus*, где в иранских образцах содержание специфического каротиноида кроцина составляло более 11 тыс мкг/г сухого вещества, а,  $\beta$ -каротин – более 320 мкг/г, что в десятки раз превышает содержание каротиноидов в плодах (Swapnil et al., 2021).

Основным каротиноидом в цветках календулы является лютеин, и цветки календулы содержат в 20 раз больше каротиноидов, чем листья. При этом окраска лепестков венчика календулы может быть от бледно-желтой (практически белой) до темно-оранжевой из-за более чем 100-кратной разницы в уровне накопления каротиноидов (Zhu et al., 2010; Fernandes et al., 2018). Были исследованы уровни мРНК многих генов биосинтеза каротиноидов календулы *CaPSY*, *CaPDS*, *CaLYCB*, *CaLYCE*, *CaBCH*, а также *CaDXS* в сортах с разнообразной окраской венчика и выявлена

корреляция между уровнем экспрессии *CaPSY1* и уровнем каротиноидов в цветках, а также показано, что *CaLYCE* экспрессируется сильнее у сортов с высоким уровнем содержания лютеина, что указывает на то, что количество лютеина определяется преимущественно активностью ликопин-циклазы LYCE. При этом сверхэксперсия *CaLYCB* не связана с более интенсивной пигментацией цветов (Park et al., 2015).

Цветки горечавки *Gentiana lutea* также ярко-желтого цвета, богаты не лютеином, а  $\beta$ -каротином и ксантофиллами. В цветках накапливаются каротиноиды *b*-ветви - зеаксантин, антероксантин и неоксантин. При этом во время развития цветка уровень мРНК *GIPSY* и *GIZDS* возрастает в 6-7 раз, что совпадает с падением экспрессии генов *GILYCB*, *GIBCH*, *GIZEP* и *GILYCE* (Ohmiya, 2011).

Анализ оранжевой, желтой и красной окраски венчика у лилий (*Lilium spp.*) показал, что основными каротиноидами в лепестках являются антероксантин, виолаксантин, лютеин и виолаксантин, тогда как красные лепестки накапливают капсантин. Увеличение содержания каротиноидов в желтых лепестках связано с повышенной экспрессией *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* и *CRTRB1/2*. При этом экспрессия *LYCB* оставалась на относительно постоянном уровне, а *LYCE* уменьшалась. Интересно, что одинаковые уровни экспрессии генов *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* и *CRTRB1/2* были и в красных, и белых лепестках, что указывает на наличие другого механизма регуляции, вероятно, связанный с экспрессией *CCD4* (Zhu et al., 2010).

#### 1.4.3. Содержание каротиноидов в запасующих органах

В семенах каротиноиды не накапливаются, а если и накапливаются, то в следовых количествах. При этом интересно отметить, что каротиноиды в семенах выполняют ряд функций, присущих другим органам и тканям растений и не таким как в плодах и листьях. Основной, и при этом специфической функцией каротиноидов в семенах является их участие в синтезе абсцизовой кислоты при созревании и защита семян.

Показано, что основными каротиноидами семян обычно является лютеин и зеаксантин. Так лютеин и зеаксантин являются преобладающими каротиноидами в зерне белого (*Panicum miliaceum*) и красного проса (*Panicum virgatum*), при этом лютеин является основным каротиноидом в белом просе (*P. miliaceum*), а зеаксантин является основным каротиноидом в красном просе (*P. virgatum*). В семенах многих масличных растений лютеин также является основным каротиноидом. Так семена подсолнечника (*Helianthus annuus*) в первую очередь накапливают именно лютеин, так же, как и семена масличного рапса (*Brassica napus*). Семена тыквы (*C. pepo*) в основном содержат лютеин (53%), а также  $\alpha$ -каротин и небольшое количество  $\beta$ -каротина (Howitt, Pogson 2006).

Показано, что каротиноиды присутствуют в значительных количествах в амилопластах кукурузы *Zea mays*. Окраска зерна кукурузы определяется содержанием и соотношением преимущественно лютеина, зеаксантина,  $\beta$ -каротина,  $\beta$ -криптоксантина и  $\alpha$ -каротина. В большинстве сортов кукурузы каротиноиды ( $\beta$ -каротин,  $\beta$ -криптоксантин и  $\alpha$ -каротин), составляют всего 0.5–2.5 мкг/г (Орловская и др., 2016). Отсутствие каротиноидов или только цветных каротиноидов соответствует белой окраске зерна, тогда как обогащение зеаксантином или лютеином – оранжевой или желтой.

Ранее посредством ассоциативного картирования, в последовательности генов кукурузы *ZmPSY1* и *ZmLCYE* были описаны полиморфные варианты, связанные с пониженной экспрессией гена и, соответственно, повышенным содержанием каротиноидов. Помимо гена *ZmLCYE* к повышению синтеза провитамина А могут приводить мутации в гене  $\beta$ -каротин-гидроксилазы 1 (*ZmCrtRBI*) – участнике  $\beta$ - $\beta$ -ветви.

Несмотря на многочисленные исследования состава каротиноидов в семенах различных растений, было идентифицировано достаточно мало транскрипционных регуляторов биосинтеза каротиноидов в этом органе. Были выявлены такие, регуляторные последовательности, как P-box и AACAA мотив, с которыми связываются P-box белки транскрипционных факторов PBF и GAMYB соответственно. Промотор гена гидролазы кукурузы *ZmCRTRB2* содержит оба элемента и в условиях *in vitro* *ZmPBF* и *ZmGAMYB* связываются с промотором этого гена. Было показано, что сверхэкспрессия каждого транскрипционного фактора по отдельности повышала уровни транскриптов *ZmCRTRB2*, но не приводила к накоплению каротиноидов. Такая регуляция работы *ZmCRTRB2*, вероятно, связана с биосинтезом АБК, а не с накоплением каротиноидов (Pesaresi et al., 2014; Stanley, Yuan 2019).

*Содержание каротиноидов в корнях, клубнях и корнеплодах.* Известно, что в корнях каротиноиды не накапливаются в больших количествах, однако, так же, как и в семенах, они необходимы для синтеза АБК. При этом сорта некоторых сельскохозяйственных растений (например, картофеля (*Solanum tuberosum*), батата (*Ipomoea batatas*) и моркови (*Daucus carota*)) могут накапливать большое количество каротиноидов в корнеплодах. Корнеплоды моркови содержат большое количество каротиноидов, в том числе  $\beta$ -каротин и в меньшей степени  $\alpha$ -каротин. Содержание  $\beta$ -каротина и  $\alpha$ -каротина, в моркови колеблется от 29 до 130 мг/кг и от 9 до 66 мг/кг соответственно (Bozalan, Karadeniz 2011; Rodriguez-Concepcion, Stange 2013). Уровень и тип накапливающихся каротиноидов, приводят к образованию белой, желтой, оранжевой или красной окраски корнеплодов. Уровни экспрессии большинства генов биосинтеза

каротиноидов моркови (*DcPSY1/2*, *DcPDS*, *DcZDS1/2*, *DcLCYE*, *DcLCYB* и *DcZEP*) увеличиваются по мере роста корнеплодов. Было показано, что сверхэкспрессия гена *DcPSY1* приводит к образованию корнеплодов с ярким оранжевым цветом, повышенным содержанием общих каротиноидов. В таких сортах увеличивается содержание  $\beta$ -каротина наряду с фитоеном, фитофлуеном и  $\alpha$ -каротином. Экспрессия *DcCRTRB* была высокой в сортах с высоким уровнем каротиноидов, что привело к усилению экспрессии и других генов биосинтеза. При этом до 70% общих каротиноидов были преобразованы в кетокаротиноиды, содержание которых составило 2400 мг/г сухого веса. Интересно, что экспрессия большинства генов биосинтеза каротиноидов изменялись в зависимости от света, за исключением *DcZDS1*, *DcLCYB2* и *DcLCYE* (Koca Bozalan, Karadeniz 2011; Rodriguez-Concepcion, Stange 2013; Alós et al., 2016).

Клубни батата (*I. batatas*) накапливают  $\beta$ -каротин и различные сорта батата характеризуются большим разнообразием окраски мякоти за счет накопления различных каротиноидов. Было показано, что сверхэкспрессия транскрипционного фактора Orange повышает содержание каротиноидов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротинов, лютеина, зеаксантина и  $\beta$ -криптоксантина в клубнях батата (Alós et al., 2016).

Клубни картофеля (*S. tuberosum*), также могут накапливать каротиноиды, но их содержание невелико и в основном представлено  $\beta$ -криптоксантином и/или лютеином (Alós et al., 2016). Сверхэкспрессия *StDXS* увеличивает содержание фитоеина и общих каротиноидов, но также смещает поток к накоплению  $\beta$ -каротина (Alós et al., 2016). Сверхэкспрессия в трансгенных растениях картофеля генов *CrtB* или *CrtO*, выделенных из различных организмов, под контролем клубнеспецифического промотора гена пататина значительно повысили концентрацию астаксантина и также общих кетокаротиноидов в клубнях (Campbell et al., 2015; Ducreux et al., 2005). Значительное повышение содержания каротиноидов в картофеле было достигнуто за счет повышенной экспрессии *CrtB*, *CrtI* и *CrtY*, под клубнеспецифичным промотором, привела к повышенному накоплению общих каротиноидов (увеличение в 20 раз) и достижению уровня  $\alpha$ -каротина до 47 г/г сухой массы. (Alós et al., 2016). Показано, что снижение экспрессии *StLCYE* повышало уровень синтеза вышестоящих каротиноидов и его замолкание приводило к накоплению  $\beta$ -каротина (Diretto et al., 2006).

Суммируя данные по синтезу каротиноидов и экспрессии генов, регулирующих их биосинтез, можно сказать, что во всех органах растения качественный и количественный состав каротиноидов определяется уровнем транскрипции генов каротиногенеза (Lado et al., 2016). Ключевым геном является ген фитоенсинтазы *PSY*, контролирующей синтез

фитоена - предшественника всех каротиноидов (рис.1.5). Накопление  $\beta$ -криптоксантина,  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротина и лютеина связано с повышенной активностью фермента *PSY1* и циклаз (*LCYB* и *LCYE*). Содержание ликопина также связано с активацией фермента *PSY*, но при этом с подавлением экспрессии *LCYB* и *LCYE*. Накопление лютеина, связано с также с активацией генов *PSY1*, *PDS*, *Z-ISO*, *ZDS*, но подавлением только *LCYB*. Содержание ксантофиллов прежде всего зависит от действия гидроксилаз (*CYP97A3* и *CYP97C1*). В целом, отличительной чертой каротиноидов в сочных плодах является их дифференциальное накопление в кожуре и мякоти, обычно с большим количеством каротиноидов в кожуре (Lado et al., 2016).

### 1.5. Регуляция биосинтеза каротиноидов

Как было упомянуто выше, каротиноиды участвуют в различных процессах в разных органах и тканях растений и на различных стадиях онтогенеза. Высока роль каротиноидов в процессе фотосинтеза и защите клеток от активных форм кислорода, образующегося как при фотосинтезе, так и в результате абиотического и биотического стрессов (Tracewell et al., 2001). Отдельную роль каротиноиды играют в процессе формирования сочных плодов и влиянию на опыление и распространение семян. В связи с этим разными функциями у растений сформировались сложные механизмы регуляции биосинтеза каротиноидов.

Регуляция биосинтеза каротиноидов представляет собой процесс контролирующей, изменение состава и содержания каротиноидов в процессе роста и развития растения и включает многоступенчатую систему транскрипционной и трансляционной регуляции, а также посттранскрипционных модификаций. Ранее было показано, что регуляция метаболизма каротиноидов в фотосинтезирующих и в запасующих тканях различна (Llorente, 2016; Lado et al., 2016).

#### 1.5.1. Регуляция биосинтеза каротиноидов в фотосинтезирующих тканях

Правильное функционирование фотосинтетических органов во многом зависит от каротиноидов (Simkin et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2014). Как было упомянуто выше, каротиноиды участвуют в процессе фотосинтеза, так как они способны поглощать световую энергию и переносить ее комплексу реакционных центров молекул хлорофилла, а также участвуют в организации и функционировании реакционных центров фотосистем и входят в состав светособирающих комплексов ССКI и ССКII хлорофиллов-a/b (Tracewell et al., 2001). Кроме того каротиноиды, являясь антиоксидантами, защищают клетки от активных форм кислорода, образующегося при фотосинтезе и в результате воздействия внешней среды. Показано, что все фотосинтезирующие организмы могут изменять

уровень экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в разных световых условиях (Simkin et al., 2003). На начальных этапах, в прорастающих семенах, экспрессия генов биосинтеза каротиноидов низкая и со временем, при появлении этиолированных проростков, запускаются связанные со светом транскрипционные механизмы, которые способствуют фотоморфогенезу (Rodriguez-Villalon et al., 2009; Toledo-Ortiz et al., 2010, 2014). Это приводит к дифференциации этиопластов в хлоропласты и далее к синтезу и накоплению хлорофилла и каротиноидов.

Транскрипционная активация светом ферментов биосинтеза каротиноидов в процессе фотоморфогенеза связана с фоторецепторными комплексами и регуляторными белками PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF), LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) и CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC (COP1) (Welsch et al., 2008; Toledo-Ortiz et al., 2010). Показано, что такие комплексы регулируют уровень экспрессии гена фитоенсинтазы *PSY* (Llorente et al., 2016). В целом PIF и COP1 действуют как белки-репрессоры. Было показано, что PIF, особенно PIF1a, непосредственно участвует в фитохромзависимой регуляции гена *PSY* по принципу негативной регуляции. PIF1 связывается с G-бокс (CACGTG), мотивом в промоторе гена *PSY*, и тем самым снижает уровень экспрессии (Toledo-Ortiz et al., 2014). PIF белки также связаны со снижением накопления каротиноидов в листьях в условиях ограниченной освещенности. Фактор транскрипции HY5, в отличие от PIF, активирует транскрипцию гена *PSY* путем связывания в последовательности промотора с тем же G-бокс мотивом или с LRE элементами, чувствительными к белому, синему, красному и дальнему красному свету, расположенными в промоторе *PSYI* (Toledo-Ortiz et al., 2014). Регуляторный белок COP1 считается ключевым репрессором фотоморфогенеза; он регулирует процессы развития и реагирует на биотический и абиотический стресс у растений. Он взаимодействует с белком HY5 и подавляет его активность, препятствуя активации экспрессии гена *PSY*.

Преобладание различных частей спектра также могут изменять синтез каротиноидов. Показано, что при высоком соотношении красного и дальнего красного света, фитохром PHYB физически взаимодействует с COP1, снижает его активность и, таким образом, освобождает HY5 от комплекса с COP1, что приводит к активации транскрипции *PSY* и дальнейшего синтеза каротиноидов. Кроме того, PHYB фосфорилирует белок-репрессор PIF. Это приводит к накоплению HY5, который затем может связываться с LRE элементами (например, E- и G-боксами) в промоторе гена *PSY* и также активизировать каротиногенез.

Было показано, что яркий свет вызывает быстрое снижение pH, что увеличивает активность фермента виолаксантиндепоксидазы (VDE), превращающий виолаксантин в зеаксантин. Это взаимопревращение между виолаксантином и зеаксантином (ксантофилловый цикл) регулируется посттрансляционно путем активации и инактивации фермента VDE интенсивным светом. Аналогичным образом избыточная освещённость увеличивает соотношение транскриптов ликопин-циклаз *LCYB* к *LCYE* в пять раз по сравнению с низкой освещённостью, что направляет биосинтез через  $\beta$ -,  $\epsilon$ -ветвь, и конечным синтезом зеаксантина (Hirschberg, 2001). При высоко интенсивном свете также активируется транскрипция гена  $\beta$ -гидроксилазы *BCH2* (= *crtRB1*) (Llorente et al., 2016).

Регуляторные белки PIF1/HY5 могут также контролировать экспрессию *PSY* в ответ на температурные сигналы, как это было показано на листьях *A. thaliana* (Toledo-Ortiz et al., 2014). Было показано, что HY5 предпочтительно связывается с промоторами генов *PSY* и *VDE* при низких температурах (Llorente et al., 2016).

Менее изученным вопросом является эпигенетическая регуляция биосинтеза каротиноидов в фотосинтетических тканях. Известно, что экспрессия гена *CRTISO* частично зависит от статуса метилирования промотора, который находится под контролем хроматин-модифицирующей гистонметилтрансферазы SDG8 и нарушение работы гена *SDG8* снижает уровень экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и подавляет синтез лютеина (Anwar et al., 2021). На растениях томата показано, что нокаут гена ДНК-деметиلاзы *SIDML2* повышает уровень метилирования генов *PSY1*, *Z-ISO*, *ZDS* и *CRTISO*, что приводит к снижению синтеза каротиноидов и деметилирование *PSY* согласуется с увеличением количества его транскриптов (Lang et al., 2017).

Также показано, что экспрессия некоторых генов биосинтеза каротиноидов зависит от окислительного-восстановительного статуса клетки. В частности, известно, что транскрипция таких генов как *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY-B*, *LCY-E* и *ZEP* зависят от окислительно-восстановительных процессов, поскольку все промоторы этих генов содержат консервативный мотив, который связывается с окислительно-восстановительным кофактором флавинадениндинуклеотидом (FAD) (Lado et al., 2016).

Можно предположить, что расширение понимания того, как биосинтез каротиноидов регулируется в фотосинтезирующих органах, приведет к расширению возможностей по выращиванию сельскохозяйственных культур с повышенной стрессоустойчивостью.

### 1.5.2. Регуляция биосинтеза каротиноидов в плодах

Изменения в составе и содержании каротиноидов в процессе роста и развития растения, так и в процессе созревания плодов связаны с регуляцией процессов каротиногенеза прежде всего на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях (Liu et al., 2015). Группу транскрипционных факторов, регулирующих уровень транскрипции генов биосинтеза каротиноидов в плодах, принято называть ripening master regulators. К данной группе относятся несколько ключевых MADS-box транскрипционных факторов, таких как RIN, NOR, CNR, а также ТФ AP2a, FUL1/2 и TAGL1.

Анализ плодов томата климактерического вида *S. lycopersicum*, созревание плодов которого зависит от этилена, показал, что основными регуляторами транскрипции генов каротиногенеза является комплекс, включающий ТФ TAGL1, RIN, FUL1 и FUL2 (рис.1.6).

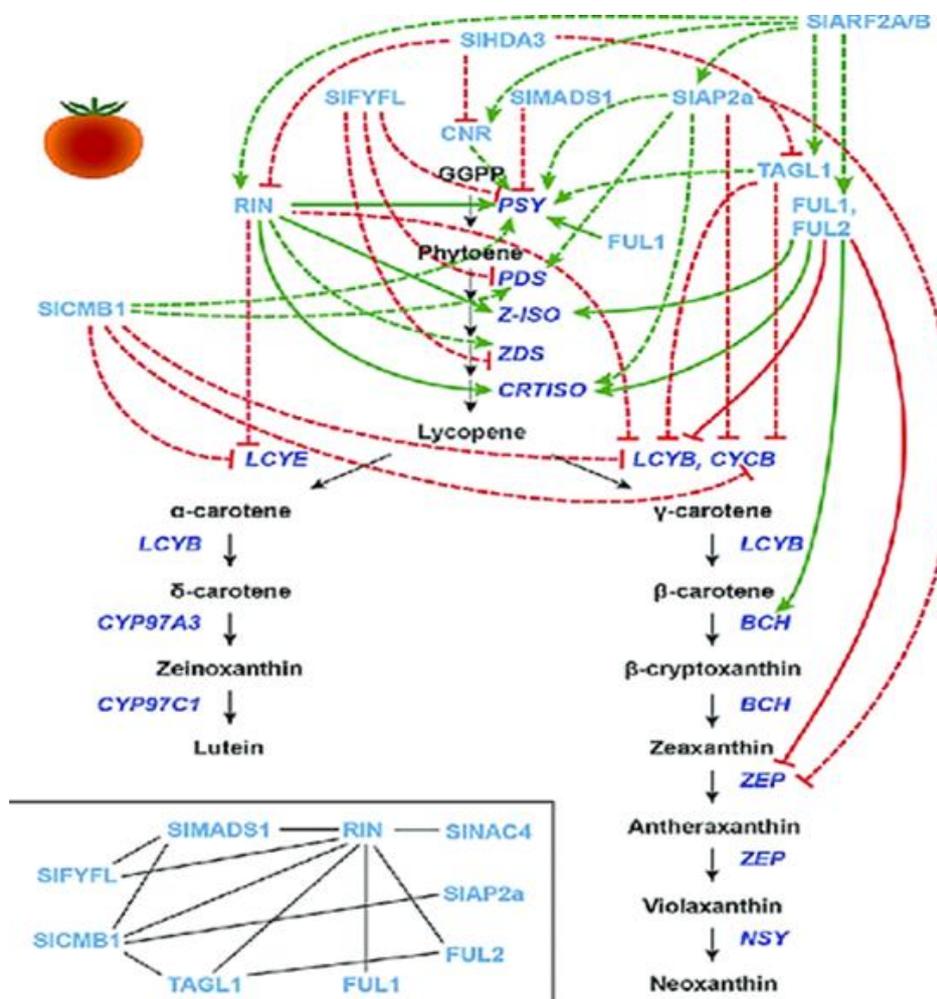


Рисунок 1.6 – Схема транскрипционной регуляция генов биосинтеза каротиноидов в плодах томата. Путь биосинтеза каротиноидов показан черным цветом, а гены биосинтеза каротиноидов обозначены темно-синим цветом. Регуляторы биосинтеза каротиноидов, показаны голубым цветом. Зеленые стрелки указывают на положительную регуляцию, а красные указывают на отрицательную регуляцию. Сплошные линии показывают прямые взаимодействия, а пунктирные линии показывают косвенные/неизвестные взаимодействия (Stenley, Yuan 2019).

Эти транскрипционные факторы влияют на экспрессию генов каротиноидов, как, в случае *SIPSY1*, *SIPSY2*, *SIZDS*, *SIZ-ISO*, *SICRTISO* и *SIBCH*, повышая ее, либо, как в случае генов *SILCYB*, *SILCYE* и *SICYCB*, воздействуя негативно (Llorente et al., 2016; Stenley, Yuan 2019). Все эти MADS-box белки прямо или косвенно влияют на транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов как непосредственно, связываясь с промоторами генов, так и косвенно, регулируя активность генов других транскрипционных факторов каротиногенеза (рис. 1.6).

Различные исследования показали, что ген *SILCYB* регулируется всеми четырьмя ТФ (*TAGL1*, *RIN*, *FUL1* и *FUL2*); Экспрессия гена *SIPSY1* помимо *RIN*, также регулируется *TAGL1*, *FUL1*; активность генов *SIZ-ISO*, *SICRTISO* и *SIZEP* зависит от *RIN*, *FUL1* и *FUL2*; уровень экспрессии *SIBCH*, *SILYCB* и *SILCYE* зависит от *FUL1/2*, *TAGL1* и *RIN*, соответственно (рис.1.6).

При этом если *RIN* активизирует транскрипцию *SIPSY*, то на ген *SILCYE* он действует как репрессор (Llorente et al., 2016; Stenley, Yuan 2019). Было показано, что *FUL1* непосредственно может связываться с промотором *SIPSY1* и активировать транскрипцию гена (Llorente et al., 2016; Stenley, Yuan 2019).

Аналогично регуляции генов каротиногенеза в листьях, не менее важными транскрипционными факторами, регулирующими процесс накопления каротиноидов в сочных плодах, являются фитохром-взаимодействующие факторы *PIF*, которые контролируют активность этих генов в плодах на свету.

Анализ плодов томата в процессе созревания позволил выявить также другие важные ТФ *SIMADS1*, *SIFYFL* и *SICMB1*, которые взаимодействуют с промоторами генов биосинтеза каротиноидов. *SIMADS1* и *SIFYFL* являются двумя негативными регуляторами биосинтеза каротиноидов, которые подавляют экспрессию *SIPSY1*, *SIPDS* и *SIZDS* (Dong et al., 2013). ТФ *SICMB1* способствует экспрессии генов *SIPSY1* и *SIPDS*, одновременно подавляя транскрипцию *SICYCB*, *SILCYB* и *SILCYE* (Llorente et al., 2016).

На примере неклиматерического вида арбуза (*Citrullus lanatus*), плоды которого, как и у томата, накапливают ликопин, показано, что, в отличие от *S. lycopersicum*, гомологи ТФ *RIN* и *TAGL1* томата не влияют на биосинтез каротиноидов, в то время ТФ *CNR*, *AP2a* и *ERF6* его усиливают (Grassi et al., 2013; Paahy et al., 2019). В отличие от арбуза, у других неклиматерических плодов, у цитрусовых, аналогично томату сверхэкспрессия гена *CsMADS6* (гомолога *TAGL1* томата) в каллусе приводила к увеличению экспрессии *CsPSY*, *CsPDS*, *CsCRTISO*, *CsLCYB2* и *CsBCH*, в то время как транскрипция *CsLCYE* была репрессирована (Lu et al., 2018).

Факторы транскрипции семейства NAC, участвующие в биосинтезе этилена, также влияют на транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов в климактерических плодах видов растений. Были исследованы уровни экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в плодах томата с низкой экспрессией *SINAC4* и показано, что *SINAC4* положительно регулирует *SIPSY1* и отрицательно - гены *SICYCB*, *SILCYB* и *SILCYE* (Zhu et al., 2014). С помощью дрожжевой двухгибридной системы было показано, что *SINAC1* взаимодействует с промоторами *SIPSY1* и сверхэкспрессия *SINAC1* снижает накопление общих каротиноидов и ликопина, но увеличивает содержание абсцизовой кислоты (Ma et al., 2014). ТФ *CpNAC2* папайи (*C. papaya*) связывается и активирует промоторы генов *CpPDS2*, *CpPDS4*, *CpZDS*, *CpLCYE* и *CpCrtrB* в плодах. Причем взаимодействие между *CpNAC2* и другим ТФ - *CpEIN3a*, увеличивает активацию этих генов у папайи (Fu et al., 2017). Также было показано, что ТФ *CpNAC1* может непосредственно связываться с промоторами генов *CpPDS2* и *CpPDS4 in vitro* и могут активировать их (Fu et al., 2017).

На количественный и качественный состав каротиноидов в плодах оказывают значительное влияние внешние факторы. Свет, являясь ключевым фактором окружающей среды, регулирует биосинтез каротиноидов в плодах и связан с фоторецепторными комплексами и регуляторными белками, однако, механизм регуляции несколько отличается от такового в листьях (Welsch et al., 2008; Pizarro, Stange 2009; Toledo-Ortiz et al., 2010). Так было показано, что в плодах томата свет стимулирует биосинтез каротиноидов и при увеличении соотношения красного и дальнего красного света в спектре в 2-3 раза увеличивается содержание ликопина в тканях околоплодника во время развития и созревания плодов (Alba et al., 2000). Более того, в плодах томата под воздействием различных импульсов красного и дальнего красного света и в условиях ограниченной освещённости наблюдается увеличение содержания каротиноидов по сравнению с облучением красным светом с постоянной длиной волны и ограниченной освещенностью, что связано с более высокой экспрессией *PSY1* (Lado et al., 2016). Воздействие на растения синим и ультрафиолетовым светом приводит к сверхэкспрессии генов *CRTISO* и *LCYB1/LCYB2* в томатах, и, как следствие, увеличению содержания ликопина и  $\alpha$ -,  $\beta$ -каротинов за счет воздействия с криптохромами (Giliberto et al., 2005).

Температура также оказывает существенное влияние на содержание каротиноидов в сочных плодах. Так показано, что высокая температура (+35°C) может специфически ингибировать накопление ликопина, стимулируя в плодах томата превращение ликопина в  $\beta$ -каротин (Nanauzu et al., 1998). Температура ниже +12°C ингибирует активность ферментов и полностью блокируют синтез ликопина в плодах томата. Содержание

каротиноидов, включая ликопин и  $\beta$ -каротин, значительно увеличивается в плодах с высоким эндогенным содержанием углекислого газа (Lado et al., 2016).

Этилен, являясь фитогормоном растений, непосредственно участвует в процессах регуляции биосинтеза каротиноидов в плодах, особенно у видов с климактерическим типом плодов. Этилен играет важную роль, так как начало созревания связано с резким увеличением синтеза этилена, что коррелирует с быстрым накоплением  $\beta$ -каротина и ликопина, а также с повышенной экспрессией *PSY1* и *PDS* (Lado et al., 2016). В связи с этим ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF) факторы являются важными регуляторными компонентами, так как связываются со специфическими GGC-box мотивами в промоторах генов биосинтеза каротиноидов. В геноме томата идентифицированы шесть ERF транскрипционных факторов. Один из них, *SIERF6*, является негативным регулятором накопления каротиноидов во время созревания плодов томатов (Lee et al., 2012). *SIETR3* и *SIETR4* высоко экспрессируются в созревающих плодах и способствуют экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в плодах томата. Показано, что сверхэкспрессия *SIERF1* также индуцирует экспрессию гена  $\zeta$ -каротин десатуразы томата *SIZDS* (Wu et al., 2019).

Имеются данные о том, что плоды томатов с более активными хлоропластами на стадии созревания могут приводить к зрелым плодам с более активными хромопластами, синтезирующие больше каротиноидов (Galpaz et al., 2008). Таким образом, уровень накопления каротиноидов, а также скорость биосинтеза каротиноидов, определяется образованием хлоропластов и их количеством в клетке. Были получены растения с высоким содержанием каротиноидов, формирующие большие пластиды (Аджиева и др., 2016; Шаптуренко и др., 2016; Lado et al., 2016). На примере плодов томата показано, что на развитие пластид влияют факторы *SIGLK*, относящиеся к суперсемейству MYB факторов транскрипции растений (Giovannoni et al., 2017). ТФ *SIGLK* также усиливает экспрессию генов *SIHYP5*, что в свою очередь активизирует *SIPSY1*, *SIPDS* и *SILCYB*, путем прямого связывания с G-box мотивами в их промоторах и образования соответствующих комплексов (Lihong et al., 2015).

Аналогично хлоропласт-содержащим органам и тканям эпигенетическая регуляция также контролирует биосинтез каротиноидов в плодах. Во время созревания плодов происходит постепенное деметилирование ДНК (Gallusci et al., 2016; Tang et al., 2020). Показано, что метилирование и деметилирование ДНК могут регулировать метаболизм каротиноидов во время созревания в климактерических плодах. Подавление гена деметилазы *SIDML2* повышает уровень метилирования ДНК, что приводит к задержке развития плодов и образования каротиноидов (Lang et al., 2017). Как и в листьях, в плодах

увеличение уровней транскриптов *PSY* согласуется с деметилированием промоторов (Fu et al., 2018) Также эпигенетическая регуляция биосинтеза каротиноидов может проходить через регулирование модификации гистонов с помощью гистоновых деацетилаз (HDAC) и гистоновых деметилаз (HDM) (Cazzonelli, Pogson 2010; Zhu et al., 2017). На томатах было показано, что гистоновые деацетилазы HDA1 и HDA3 регулируют биосинтез этилена и созревание плодов, а также изменяют содержание каротиноидов. Ингибирование *SLHDA1* и *SLHDA3* приводит к усилению биосинтеза этилена, что приводит к более раннему созреванию плодов и увеличению количества каротиноидов. Анализ экспрессии генов показал, что в растениях с инактивированными генами *SIHDA1* и *SIHDA3* экспрессия *SIPSY1* была выше (Guo, 2022). Недавняя работа показала, что гистон-лизиндеметилаза JMJ6, способствует созреванию плодов томата и накоплению каротиноидов за счёт снижения уровня метилирования лизина в гистоне H3 (H3K27me3), и связанных с ним генов созревания, таких как *RIN*, *DML2*, *ACO1* и *ACS4*. Сверхэкспрессия *SLJMJ6* в 3-4 раза усиливала экспрессию *PSY1* и *Z-ISO* (Sun et al., 2022).

#### 1.6. Таксономия и филогения видов томата *Solanum* секции *Lycopersicon*

Впервые виды томата *S. lycopersicum* и *S. peruvianum* были описаны Карл Линней, который, вместе с картофелем *S. tuberosum*, отнес их к роду *Solanum*. Позднее в 1768 году Ф. Миллером было описано еще шесть новых видов томатов, которые он выделил в отдельный род *Lycopersicon* (Rick et al., 1990). Практически до начала XXI века систематики относили томаты к роду *Lycopersicon*. Один из наиболее крупных систематиков томатов, С. Rick, изучая межвидовое скрещивание томата и близкородственных видов рода *Solanum* показал взаимосвязь родов *Solanum* и *Lycopersicon*, а также на основании морфологии и способности к скрещиванию выделил в пределах рода *Lycopersicon* девять видов томатов, которые были подразделены на два комплекса *Esculentum* и *Peruvianum* на основе морфологии плодов и типов опыления (Rick et al., 1990). К комплексу *Esculentum* были отнесены семь видов (*L. pimpinellifolium*, *L. esculentum*, *L. cheesmaniae*, *L. chmielewskii*, *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. pennellii*, *L. hirsutum* и *L. pennellii*) самоопыляемых и частично самоопыляемых, включающих как виды с красно- и желтоокрашенными гладкими плодами, так и с опушенными зелеными плодами. Комплекс *Peruvianum* включал *L. chilense* и *L. peruvianum* строго перекрестно-опыляемые виды с опушенными зелеными, которые очень редко могут скрещиваться с культивируемым видом *L. esculentum* (Rick, 1990).

В последние десятилетия с развитием генетических технологий, изучение геномов растений вышло на новый уровень и стало накапливаться все больше, прежде всего,

молекулярных данных, а также цитологических и данных о способности видов томата скрещиваться с другими видами *Solanum*, подтверждающих, что томаты не должны быть выделены в отдельный род и виды томата являются типичными представителями рода *Solanum* (Peralta and Spooner, 2005). В 2008 году классификация томатов была пересмотрена и виды томата, к которым добавилось три вида дикорастущих томатов: *Solanum galapagense* с оранжевыми плодами, эндемичный для Галапагосских островов и два новых зеленоплодных перуанских вида *S. arcanum* и *S. huaylasense*, были отнесены к *Solanum* sect. Lycopersicon (Peralta et al., 2008).

В настоящее время выделяют 13 видов томатов *Solanum* секции Lycopersicon, имеющие монофилитическое происхождение (Peralta et al., 2008; Knapp et al., 2005; Rick et al., 1990). Данный состав секции и его филогения поддерживается как морфологическими, так и молекулярными данными (Peralta et al., 2008; Rodriguez et al., 2009; Barnett et al., 2023). I.L. Peralta с соавторами (2008) интерпретировали многочисленные, а часто и противоречивые наборы морфологических и молекулярных данных, чтобы выделить Lycopersicon четыре неформальные «видовые группы» внутри секции Lycopersicon: Arcanum, Eriopersicon, Neolycopersicon и Lycopersicon. Группа видов Lycopersicon являющаяся эволюционно более молодой, включает четыре самоопыляющихся вида с плодами от красного до оранжевого цвета: *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, и эндемики Галапагосских островов *S. cheesmaniae* и *S. galapagense* (рис.1.7).

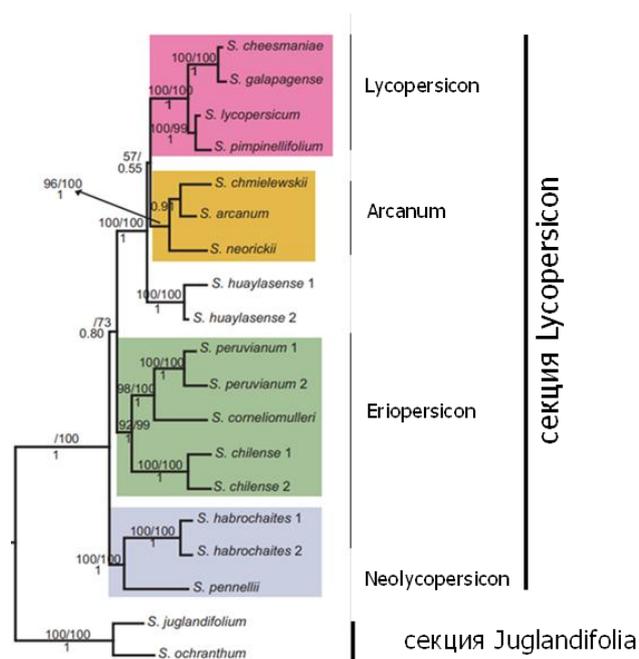


Рисунок 1.7 – Дендрограмма, построенная по данным анализа 11 COSII последовательностей (1.799 парсимони-значимых сайтов генома) (по Rodriguez et al., 2009).

Данная группа включает две клады - одна сформирована культивируемым видом *S. lycopersicum* (включая все дикорастущие подвиды и сорта) и близкородственным видом, считающимся предком *S. lycopersicum*, видом *S. pimpinellifolium* (Razifard et al., 2020). Остальные три группы секции (Arcanum, Eriopersicon, Neolycopersicon) представлены видами томата с различным типом опыления (перекрестным типом и смешанным типом), зеленой окраской опушенных плодов (рис.1.7). Эти группы считаются эволюционно более древними в сравнении с группой Lycopersicon и вид *S. pennellii* – эволюционно наиболее древний из видов всей секции.

Считается, что согласно молекулярному датированию, выделение секции Lycopersicon произошло около 2 млн лет назад (1,2-2,6 млн лет назад). Сам культивируемый томат принадлежит к эволюционно наиболее поздно выделенной группе Lycopersicon и *S. lycopersicum*-это не дикий вид, а скорее одомашненное растение, полученное от своего дикого прародителя *S. pimpinellifolium* (Razifard et al., 2020; Klee et al., 2020) около 78 тыс. лет назад.

### 1.7. Каротиногенез в плодах томата

Культивируемый вид томата *S. lycopersicum* является одним из основных овощных культур, благодаря своей высокой питательной ценности и вкусовым качествам, содержанием сахаров, органических кислот, витаминов и каротиноидов. Поскольку плоды определяют пищевую и диетическую ценность томата, то одним из актуальных направлений молекулярной генетики томата стало изучение генов, контролирующих развитие плодов (в том числе, форму, размер, количество камер), накопление первичных метаболитов (сахаров и крахмала), а также важных вторичных метаболитов (каротиноидов, флавоноидов, органических кислот, и др.), определяющих вкусовые, пищевые и диетические свойства.

Плоды у видов томата представляют собой дву- реже, многокамерную ягоду и различаются окраской. Зрелые плоды большинства дикорастущих видов секции Lycopersicon, так же как и представители большинства других секций рода *Solanum*, имеют зеленую окраску за счет синтеза хлорофилла в эпикарпе и мезокарпе зрелого плода и низкого содержания каротиноидов, сопоставимого с таковым в листьях (Kilambi et al., 2017). Исключение составляют плоды видов *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* и *S. galapagense*. Ярко красный цвет зрелого плода – характерная черта культивируемого вида *S. lycopersicum* и дикорастущего *S. pimpinellifolium*. Данная окраска является результатом накопления ликопина. Дикорастущим видам *S. cheesmaniae* и *S. galapagense*, эндемичных для Галапагосских островов, с желто-оранжевой окраской

плодов, также характерно накопление каротиноидов в зрелом плоде, но не ликопина, как у плодов *S. lycopersicum* и *S. pimpinellifolium*, а преимущественно  $\beta$ - или  $\delta$ -каротина. Из этого следует, что у культивируемого и дикорастущих видов томата окраска зрелого плода представлена достаточно широким спектром, что делает эти виды хорошей модельной системой для изучения синтеза и накопления каротиноидов в плодах. Среди других представителей рода *Solanum*, чьи плоды или клубни съедобны, наиболее распространенным каротиноидами являются ликопин,  $\beta$ -каротин, фитоен и фитофлуен (Wegener, Jansen 2011). Достаточно богаты каротиноидами, например, плоды видов *S. betaceum* (секц. *Pachyphylla*) и *S. sessiliflorum* (секц. *Lasiocarpa*). Тамарилло, *S. betaceum*, известен своим высоким содержанием каротиноидов в плодах, наиболее распространенными из которых, являются  $\beta$ -криптоксантин,  $\beta$ -каротин, зеаксантин и лютеин (Wegener, Jansen 2011). Плод *S. sessiliflorum* богат ликопином и содержит более высокий уровень  $\beta$ -каротина, чем культивируемый томат (Wegener, Jansen 2011). Клубни *S. tuberosum* накапливают  $\beta$ -каротин, астаксантин и зеаксантин, а клубни *S. phureja* - зеаксантин, виолаксантин, антероксантин, лютеин и  $\beta$ -каротин (Wegener, Jansen 2011).

#### 1.7.1. Накопление каротиноидов в плодах разных видов томата

Зеленоплодные представители секции *Lycopersicon* (группы *Neolycopersicon*, *Eripersicon*, *Arcanum*), к которым относятся *S. habrohaites*, *S. pennellii*, *S. neorichii*, *S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. arcanum* и *S. huaylasense* во внешнем слое перикарпа зрелого плода накапливают хлорофилл, что и определяет их зеленую окраску. Зеленый цвет плода практически не изменяется в процессе созревания и только на последней стадии окраска перикарпа плода приобретает небольшую желтизну за счет деградации хлорофилла (Meléndez-Martínez et al., 2010). Зеленоплодные виды томата не накапливают ликопин, тем не менее у них есть локусы, связанные с накоплением каротиноидов, так как синтез каротиноидов в их плодах, как и в любой фотосинтезирующей ткани, происходит. Было показано, что в плодах зеленоплодных видов *S. habrohaites* и *S. pennellii* имеют нормальную экспрессию специфических для плодов генов *PSY1* и *LCYB1* (Bolger et al., 2014; Kilambi et al., 2017).

В отличие от красноплодного *S. lycopersicum*, исследования биохимии плодов зеленоплодных видов были ограничены лишь несколькими видами (*S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*). Так было показано, что у дикорастущего вида *S. chilense*, образующего мелкие, бледно-зеленые зрелые плоды, профиль каротиноидов и соотношение хлорофилл:каротиноиды при созревании практически не изменяется в течение всего времени созревания (Botter et al., 2018).

На примере анализа варибельности гена ликопин- $\beta$ -циклазы *LCYB* было выявлено большое количество полиморфизмов (63 SNPs), отличающих гены дикорастущих видов от последовательности гена культивируемого красноплодного *S. lycopersicum*. При этом наибольшая разница была показана при сравнении красноплодного и зеленоплодных видов (20 SNPs у *S. neorickii* и *S. peruvianum* и 32 SNPs у *S. pennellii*). В то время как *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* различались лишь 8 SNPs (Araújo et al., 2007). Таким образом, низкий уровень накопления каротиноидов в плодах зеленоплодных томатов, возможно, связан в том числе и с SNPs в гене *LCYB*. Для исследованных зеленоплодных видов было показано, что в их плодах лютеин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротины являются основными каротиноидами. Дикие зеленоплодные виды сохраняют белки, связанные с фотосинтезом, и не имеют белков, участвующих в превращении хлоропластов в хромопласты.

Развитие плодов у вида томата *S. lycopersicon* считается моделью для изучения развития сочных плодов растений, поэтому именно для культивируемого вида *S. lycopersicon* накоплено наибольшее количество данных по различным генам и генным сетям, контролирующим процессы, происходящие при созревании плода, в том числе и процессам биосинтеза каротиноидов в процессе плодообразования (Cazzonelli 2010; Navaux, 2014; Islam et al., 2018; Pinheiro et al., 2019; Kapoor et al., 2022 и др).

Плод томата, так же как и любой другой сочный плод, в процессе развития проходит несколько стадий, характеризующихся морфо-физиологической и биохимической спецификой (рис. 1.8) (Shinozaki et al., 2018; Pereira da Costa et al., 2018).

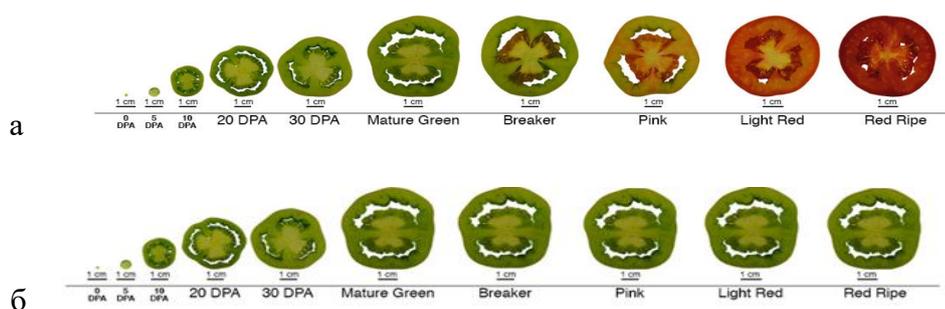


Рисунок 1.8 – Стадии развития плодов томатов: коасноплодного вида *S. lycopersicum* (а), зеленоплодного вида *S. pennellii* (б). Основные этапы: Immature green – (DPA0-30) – растущий незрелый плод, Mature Green (MG) – плод достиг предельного размера, но ещё не начал созревать. Breaker (Br) – начинается процесс созревания плода, меняется окраска эндокарпа. Pink (Pk) 30 – 60% плода окрашены. Light Red (LR) 60 – 90% плода окрашены. Red Ripe (RR) – плод биологической спелости, полностью окрашен, становится мягким, Fully Ripe FR- плод биологической спелости зеленоплодного вида, становится мягким (DPA – дни после опыления).

После опыления плод томата начинает расти (**стадия IG**), при этом зеленая окраска плода остается неизменной; качественный и количественный состав каротиноидов в

растущих плодах аналогичен таковому в листьях и других хлоропласт-содержащих тканях растения. Уровень биосинтеза каротиноидов достаточно низкий. В плоде IG помимо большого количества хлорофилла в основном присутствуют такие каротиноиды как лютеин и  $\beta$ -каротин. Уровни других каротиноидов, а именно виолаксантина и неоксантина, незначительны. Бесцветные каротиноиды фитоен и фитофлюен на этой стадии не обнаруживаются (Meléndez-Martínez et al., 2010).

Основными генами, определяющими биосинтез и конечный уровень каротиноидов, являются гены фитоенсинтазы *PSY*. В геноме красноплодного вида *S. lycopersicum* сначала были обнаружены два основных гена *SIPSY1* и *SIPSY2*, характерные для геномов большинства растений, которые обеспечивают синтез каротиноидов в плодах и фотосинтезирующих тканях соответственно (Fraser et al., 1994, 2007). Показано, что паралогичные гены *PSY1* и *PSY2*, которые возникли в результате дупликации и последующей субфункционализации, кодируют белки с высокой гомологичной структурой, но с разными биохимическими свойствами (Fraser et al., 2000, Sato et al., 2012). Однако особенностью этих генов у томата является высокая органо-специфичность экспрессии генов *PSY*: *SIPSY1* транскрибируется в созревающих и зрелых плодах красноплодных видов (начиная со стадии MG/BR (рис.1.8), в то время как *SIPSY2*-преимущественно в фотосинтезирующих органах. В целом, транскрипция *SIPSY1* в 10 раз выше, чем транскрипция *SIPSY2* (Fraser et al., 1999), что может быть объяснено тем, что каротиногенная активность белка *PSY1* ниже, чем *PSY2*, что может быть причиной более высокого уровня экспрессии гена *SLPSY1* при синтезе каротиноидов в спелых плодах красноплодных видов (Cao et al., 2019). Показано, что синтез каротиноидов в плодах не происходит в отсутствие транскрипции *SLPSY1*, в то время как сверхэкспрессия *SLPSY1* значительно увеличивает каротиногенез плодах (Ducieux et al., 2005; Fraser et al., 2007).

Недавно, как у однодольных, так и двудольных растений был идентифицирован третий фермент *PSY* (*PSY3*), который в основном участвует в синтезе корневых апокаротиноидов (стриголактонов, абсцизовой кислоты), участвующих в создании симбиотических и ответных реакциях, а также способствующих адаптации (Kachanovsky et al., 2012; Fantini et al., 2013; Águila Ruiz-Sola et al., 2014; Stauder et al., 2018).

На **стадии MG** плод томата достигает своего максимального размера и содержит только хлоропласты, при этом состав каротиноидов остается прежним, как на стадии IG. Как и на предыдущих стадиях, на состав и соотношение каротиноидов и хлорофиллов в плоде значительное влияние оказывают различные свето-индуцируемые ТФ. На стадии MG хлорофиллы поглощают синий и красный свет (примерно от 450 нм до 650 нм), а

дальний красный свет проникает внутрь плода. Таким образом, уменьшается отношение красного света к дальнему красному свету внутри плода. Это приводит к тому, что транскрипционный регулятор *SIP1a* непосредственно воздействует на ген *SIPSY1* по принципу негативной регуляции: PIF1a связывается с промотором *SIPSY1*, подавляя его экспрессию на стадии MG (Toledo-Ortiz et al., 2010, 2014). Как было упомянуто выше, фитохром PHYB может фосфорилировать белок-репрессор PIF (Koschmieder et al., 2017). В плодах фитохромы PHY регулируют размер клеток и развитие пластид, где происходит синтез хлорофилла и каротиноидов, что приводит к максимальному росту плода на стадии MG (Tang et al., 2022). Гены *SIPHYB2* и *SIPHYF* преимущественно экспрессируются в плодах, тогда как *SIPHYB1* - в основном в листьях, а *SIPHYA* - в корнях. Показано, что сверхэкспрессия *SIPHYB2* в плодах повышает содержание каротиноидов и экспрессию генов, которые обеспечивают необходимых предшественников для синтеза каротиноидов (Llorente et al., 2016). Ещё одним свето-зависимым негативным регулятором биосинтеза каротиноидов является *SIPRE2*, который подавляется в томатах под действием высокоинтенсивного света. Сверхэкспрессия *SIPRE2* на стадии MG подавляет транскрипцию генов биосинтеза хлорофилла и биосинтеза каротиноидов, таких как *SIPSY1*, *SIPDS* и *SIZDS* (Zhu et al., 2017). Таким образом, как и в фотосинтезирующей ткани, активаторы и репрессоры световой сигнализации выполняют сходные функции в регуляции синтеза каротиноидов в плодах.

На следующем этапе развития плода томата на **стадии BR**, на которой плод *S. lycopersicum* начинает приобретать красноватое окрашивание, начиная с верхушки плода; начинаются процессы деградации хлорофиллов и развития хромопластов под действием ТФ ORANGE (Ashraf et al., 2018). Свет, достигающий мякоти плода, постепенно обогащается красным светом, увеличивается доля красного к дальнему красному. В это время, начинается деградация *SIP1a*, что приводит к увеличению экспрессии *SIPSY1* и, как следствие работы *SIPSY1*, синтезу фитоена, являющимся основой для синтеза других каротиноидов томата. На стадии BR с кончика плода, начинает проявляться красная окраска, обусловленная началом синтеза и накопления ликопина, в результате сильной активации генов каротиногенеза, таких как *SIPDS*, *SIZ-ISO*, *SICRTISO* и снижения содержания хлорофилла (Fraser et al., 2000; Fraser, Bramley 2004; Llorente et al., 2016; Kumar et al., 2016; Quian-Ulloa, Stange 2021; Tang et al., 2022).

Максимальное накопление каротиноидов, в частности ликопина и каротина, наблюдается именно на стадии BR (Bartley, Scolnik 1993; Llorente et al., 2016; Tang et al., 2022; Kumar et al., 2016). Транскрипты мРНК гена *SIPSY* также можно обнаружить на

стадии Bg и Pk (розовая окраска плода) (рис.1.7), а также в цветках, однако сложно детектировать в листьях и плодах на стадии MG. Аналогично транскриптам *SIPSY*, гены *SIPDS* и *SIZDS* достаточно высоко экспрессируются в созревающих плодах на стадиях BR и Pk и в то же время исчезают мРНК обоих ликопинциклаз (*SILCYB* и *SILCYE*) (Kachanovsky et al., 2012). Эти изменения в экспрессии генов показывают, что плоды *S. lycopersicum* на стадии BR начинают накапливать ликопин, но не происходит дальнейшего перехода ликопина в другие каротиноиды *b*, *b*- и *b*,  $\epsilon$ -ветви (рис.1.3, 1.4).

Как только плод достигает **стадии RR** (рис.1.7), весь плод подвергается воздействию высокого соотношения красного и дальнего красного света, что приводит к усилению синтеза каротиноидов и высокому их накоплению что, является результатом изменения многочисленных физиологических изменений, контролируемых гормональными сигналами, сигналами окружающей среды (Giliberto et al., 2005; Fraser et al., 2007; Quian-Ulloa, Stange 2021). Наблюдается резкое увеличение синтеза и накопления, прежде всего, ликопина. Экспрессия структурных генов биосинтеза каротиноидов, включая *SIGGPS*, *SIPSY1*, *SIPDS*, *SICRTISO*, *SIZDS* и *SIZISO*, достигает максимума (Jalil, Ansari, 2020). Количество белка SIPIF1a, приводящего к ингибированию транскрипционной активности *SIPSY1*, снижается примерно в пять раз по сравнению со стадией MG. При этом снижается активность транскрипционных факторов SIRIN и возрастает активность SITAG1, SIFUL1, SICMB1 и SINAC4, которые способствуют экспрессии генов *SIPSY1* и *SIPDS* (Yoo et al., 2017). На стадии RR в 4 раза повышается активность *SIPSY1* по сравнению с активностью гена на стадии BR (Faster et al., 1994).

Таким образом, по мере созревания плодов IG-BR-RR фотосинтетическая активность уменьшается, хлоропласты преобразуются в хромопласты, экспрессия генов биосинтеза каротиноидов изменяется, что приводит к синтезу и накоплению каротиноидов в хромопластах.

На примере модельного сорта M82 *S. lycopersicum* с красной окраской плодов было проанализировано содержание каротиноидов в процессе развития плодов на стадиях IG ,MG, BR и RR) (Yazdani et al., 2019). На стадии IG плоды сорта M82 имели зеленую окраску и общее содержание каротиноидов составило 5.12 мкг/г свежей ткани. При этом в плодах синтезировались только  $\beta$ -каротин и лютеин, содержание которых составляло 2.12 и 2.65 мкг/г, соответственно. На стадии MG плод M82 достигал финального размера, но оставался зеленым. Каротиноидный состав был сходен с таковым на стадии IG, но содержание  $\beta$ -каротина и лютеина несколько падало до 1.74 мкг/г и 2.02 мкг/г, соответственно, а общее содержание каротиноидов составило 5.05 мкг/г. На стадии BR

происходили изменения в качественном и количественном составе каротиноидов. Наряду с  $\beta$ -каротином (2.59 мкг/г) и лютеином (2.00 мкг/г), чья концентрация повышается в сравнении со стадиями IG и MG, также начинается синтез других каротиноидов: фитоена (1.36 мкг/г), фитофлуена (1.27 мкг/г),  $\zeta$ -каротина (1.28 мкг/г) и, главное, ликопина (1.42 мкг/г) – основного каротиноида плода томата. Общее содержание каротиноидов на стадии BR повышалось более чем в два раза и составило 12.36 мкг/г.

Стадия полного созревания плода RR сорта M82 характеризуется максимальным покраснением всего плода и максимальным уровнем накопления каротиноидов, достигая 71.12 мкг/г. Состав каротиноидов остается таким же, как и на предыдущей стадии BR, за исключением того, что начинается синтез  $\alpha$ -каротина, чье содержание составляет 2.46 мкг/г и который не детектировался ранее. При этом надо отметить, что общий синтез каротиноидов повышается на стадии RR в сравнении с BR. И если синтез отдельных каротиноидов в сравнение со стадией BR увеличивается не более чем в 3.6 раз, то содержание ликопина увеличивается в 30 раз (Yazdani et al., 2019).

Таким образом, по мере созревания плода томата изменяется состав каротиноидов: в зеленых плодах IG и MG, как и в листьях, преобладает  $\beta$ -каротин и лютеин. На дальнейших стадиях резко увеличивается состав каротиноидов и на стадии BR начинает синтезироваться ликопин, который становится основным каротиноидом на стадии RR, в результате чего зрелый плод M82 приобретает ярко-красную окраску. В процессе каротиногенеза в плоде томата сорта M82 содержание общих каротиноидов увеличивается в 2, 8 и 14 раз на стадиях MG, BR, RR по сравнению с IG (Kilambi et al., 2017).

Данная тенденция синтеза и накопления каротиноидов характерна и для плодов других сортов *S. lycopersicum* с той разницей, что состав и количество каротиноидов может меняться, что приводит к различиям в окраске зрелого плода у различных сортов (Lenucci et al., 2009; Li et al., 2013; Flores et al., 2017). Анализ различных красноплодных сортов томата показал, что в целом на стадии зеленого плода каждого сорта более 95% от общих каротиноидов составляли  $\beta$ -каротин и лютеин, в то время как на стадии полного созревания до 80-90% может быть представлено ликопином (Lenucci et al., 2009). Такие качественные и количественные изменения в составе каротиноидов во время созревания сортов томата с различной окраской плода, как было сказано выше, связаны с различной экспрессией генов биосинтеза каротиноидов, прежде всего *SIPSY1*, *SIPDS*, *SICRTISO*, *SIZDS*, *SIZISO*, а также обеими ликопин-циклазами *SILCY* (Lenucci et al., 2009; Li et al., 2013; Flores et al., 2017).

Разнообразие окраски зрелых плодов у сортов культивируемого томата *S. lycopersicum* огромно: от практически белого, через розовый и бледно-желтый, красного и желтого до бордово-красного и темно-оранжевого. Окраски плодов сортов томата является результатом, качественного и количественного состава каротиноидов, а также, в меньшей степени, антоцианов и хлорофиллов (Lenucci et al., 2009).

Содержание общих каротиноидов в плодах сортов *S. lycopersicum* с красной и темно-красной окраской составляет 226-278 мкг/г. При этом на долю ликопина приходится более 60% от общего содержания каротиноидов. Содержание  $\beta$ -каротина и лютеина составляет 45 мкг/г и 3 мкг/г соответственно. Бордовая и зелено-бордовая окраска плодов является результатом сочетания высокого содержания ликопина, а также антоцианов и хлорофиллов. Сорта с желтой и оранжевой окраской плодов характеризуются достаточно высоким уровнем общих каротиноидов (120-258 мкг/г), однако, у них возрастает доля  $\beta$ -каротина (до 60% от всех каротиноидов) и падает концентрация ликопина до 50 мкг/г. Содержание лютеина также остается на низком уровне. У образцов со светло-желтой и практически белой окраской плодов общее содержание каротиноидов низкое (менее 8 мкг/г) (Lenucci et al., 2009; Li et al., 2013; Flores et al., 2017; Deineka et al., 2021; Курина и др., 2021; Dzhos et al., 2023).

Таким образом, в красных плодах томата ликопин,  $\beta$ -каротин, лютеин являются основными каротиноидами. При этом соотношение содержания ликопина к другим каротиноидам достаточно широко изменяется у сортов. Высокое содержание общих каротиноидов у всех сортов напрямую коррелирует с экспрессией генов *SIPSY1* и *SILCY*. Накопление  $\beta$ -каротина связано с дифференциальной экспрессией генов *SILCY* (Cunningham, Gantt 2001; Mialoundama et al., 2010; Giorio et al., 2013; Christianson, 2017). Ярко-оранжевая окраска томата определяется высоким содержанием проликопина из-за мутации *tangerine* в гене *SICRTISO* (Isaacson et al., 2002; Pinheiro et al., 2019).

В связи с тем, что красноплодный томат *S. lycopersicum* является модельной системой для изучения сочных плодов двудольных растений и геном его сорта Heinz полностью секвенирован (GCA\_000188115.4), то достаточно много известно о генах биосинтеза каротиноидов и их экспрессии в различных органах и тканях плода этого вида, а также в процессе созревания. Однако изучение генных путей биосинтеза каротиноидов в плодах томата сфокусировано практически на одном красноплодном культивируемом виде *S. lycopersicum* и на ограниченном наборе модельных красноплодных сортов (M82, Heinz 1706, Alice Craig, MicroTom). При этом образцы других дикорастущих видов томата используются в исследованиях достаточно редко (*S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S.*

*peruvianum*, *S. habrochaites*), либо практически никогда (*S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagense*, *S. neorickii*) при том, что дикорастущие виды как красноплодные, так и оранжево- и зеленоплодные значительно различаются по качественному и количественному составу каротиноидов в плоде. Достаточно мало известно о последовательностях этих генов у видов томата иных, чем *S. lycopersicum*, об особенностях их экспрессии и регуляции. Таким образом, у видов томата секции *Lycopersicon* окраска зрелого плода, как результат качественного и количественного каротиноидного состава, представлена достаточно широким спектром, что делает данную группу хорошей модельной системой для изучения синтеза и накопления каротиноидов в плодах и их характеристика позволит прояснить особенности и эволюцию генов каротиногенеза у видов томата.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Растительный материал

Растительный материал, который содержал 12 дикорастущих видов и 36 сортов *S. lycopersicum*, используемый в работе, предоставлен в табл. 2.1. Растения выращивали в теплице при температуре 23°C в течение 16-часового/8-часового светового цикла день/ночь (интенсивность света 300–400 моль/м<sup>2</sup>с). Листья, бутоны, лепестки, плоды на разных стадиях развития (IG-2, MG, BR, RR для сортов томата *S. lycopersicum*, образцов желтоплодных и красноплодных видов; MG и FR для образцов диких зеленоплодных видов) собирали в двух биологических повторностях, гомогенизировали в жидком азоте и хранили при температуре - 80°C.

Таблица 2.1 Коллекция растительных образцов, использованных в исследовании

Образцы дикорастущих и культивируемых видов томата из коллекции TGRC (Rick Tomato Genetics Resource Center, США) и ВИР им.Н.И. Вавилова				
№	Вид	Кат. №	Цвет плода	Страна происхождения
1	<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i>	VIR1018	Красный	Эквадор
2	<i>S. cheesmaniae</i>	LA0421	Желтый	Эквадор
3	<i>S. chilense</i>	LA2884	Зеленый	Чили
4	<i>S. chilense</i>	LA1963	Зеленый	Перу
5	<i>S. pennellii</i>	LA0716	Зеленый	Перу
6	<i>S. pennellii</i>	LA1926	Зеленый	Перу
7	<i>S. habrochaites</i>	LA1777	Зеленый	Перу
8	<i>S. habrochaites</i>	LA2144	Зеленый	Эквадор
9	<i>S. chmielewskii</i>	LA2663	Зеленый	Перу
10	<i>S. neorickii</i>	LA2133	Зеленый	Эквадор
11	<i>S. arcanum</i>	LA2157	Зеленый	Перу
12	<i>S. peruvianum</i>	LA1954	Зеленый	Перу

<b>Сорта/линии томата <i>S. lycopersicum</i> (ФГБНУ ФНЦО)</b>					
<b>№</b>	<b>Сорт</b>	<b>Цвет плода</b>	<b>№</b>	<b>Сорт</b>	<b>Цвет плода</b>
1	Heinz	Красный	24	Подарок к юбилею	Красный
2	Black Jack	Бордовый	25	Гаяна	Красный
3	Black cherry	Бордовый	26	Русский размер	Красный
4	Paul Robson	Красный	27	Дубок	Красный
5	Christmas blueberry	Бордовый	28	Л-411	Темно красный
6	Zemba	Темно красный	29	Черри розовые	Розовый
7	Корнеевский	Красный	30	Черри арбуз	
8	Малиновый силач	Красный	31	Л-176	Темно-красный
9	Гармошка	Красный	32	Черри коричнево-фиолетовые	Темно красный
10	Копилка желтая	Желтый	33	Оранжевый гигант	Оранжевый
11	Черри желто-оранжевые линия	Желтый	34	ТТ-15300	Желтый
12	Несозревающий (линия NN-25)	Зеленый	35	Де-Барао оранжевый	Оранжевый
13	Черри лимонно-желтые линия	Светло желтый	36	Осенняя рапсодия	Желтый
14	Викинг	Желтый	37	Хурма	Желтый
15	Золотой лотос	Желтый	38	Органза	Оранжевый
16	Грот	Красный	39	Оранжевое чудо	Оранжевый
17	Благодатный	Красный	40	Алтайский оранжевый	Оранжевый
18	Лотос	Красный	41	Черри овально-оранжевые линия	Желтый
19	White beauty	Зеленый	42	Долгоносик	Желтый
20	Черри оранжевые линия	Оранжевый	43	Дынюшка 1с-эп	Желтый
21	Yellow Peach	Желтый	44	Дынюшка 2с-эп	Желтый
22	Жидкова	Желтый	45	Big Rainbow	Желто-красный
23	Long John	Красный			

Помимо образцов томата для сравнительного анализа полиморфизма и экспрессии были взяты образцы рода *Capsicum* с различной окраской спелого плода.

### Идентификация генов амплификации ДНК, клонирование фрагментов

Для амплификации полноразмерных генов у образцов красноплодных и зеленоплодных видов томата использовали ген-специфические праймеры (таблица 2.2), разработанные на основе референсных последовательностей генов *S. lycopersicum* (сорт Heinz 1706), доступных в NCBI GenBank и Sol Genomics Network.

Таблица 2.2 Список праймеров

Праймер	Последовательность (5'→3')	Использование
PSY1geneF	AGTGGGAATCTACTAGGAGT	амплификация гена
PSY1geneR	TTATCTTTGAAGAGAGACAGTTT	
tPSY_F6	CTATCTGGGCAATATATGGTG	секвенирование гена
tPSY_F7	TCTCGTCCTAGATACTACAC	
tPSY_F8	CAGTGACGAGCCATGATC	
tPSY_F9	TTGAGCTTGTCGTTCTCAGT	
PSY1rtF	CTGAGATCTACCAATGAGTTAG	qRT-PCR, <i>PSY1</i>
PSY1rtR	TCTCGGGAGTCATTAGCATAG	
prPSY1-F	GTTGGATTTGCATGTAGACC	амплификация и секвенирование промотора
tPSY_F2	GGCTAAATCGAAAATYGAATC	
tPSY_F3	ТААСТТТСТАТТГСТТТГСТАГТГ	
tPSY_F4	TGGTAGGTAATATTGCTGATTTTG	
Actin 2/7-F	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC	qRT-PCR, референсные гены
Actin 2/7F-R	TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG	
Expressed-F	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	
Expressed-R	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	
Z-ISOpromF	GCCACAGGGAGATTACATAG	амплификация гена и тосеквенирование
Z-ISOendR	GGAAACGAGTTATGTAACATCAG	

Z-ISOstartF	CACTTAAGAGCTCACATAATCTTGT	секвенирование
Z-ISOinF3new	TAGTGTATCATTGCCCCACT	
Z-ISOgsF4	TTCTAGTATTTCAGATAGCC	
Z-ISOgsF5	TCCAGCACACCTTTACTATT	
Z-ISOgsF6	TGGTGTTAGTCTTGTGTAGTT	
P Z-ISOgsF7	ACAGTGGTCTTGCTAGTCTT	
Z-ISOgsF8	ATAATGTGCCTTGTCCCGAA	
Z-ISOinF1	CTTCTGCTTGTAGATTCTC	
Z-ISOinF2	TAGAATATAGAATCAAGTG	
Z-ISOpromR	CCATAAATGGATACAATATAAAA	
Z-ISOR3new	AGTGGGCAAATGATACTA	
Z-ISOrtF	GGATTGACAATTCTACTGGATTTGG	qRT-PCR
Z-ISOrtR	CTAGCAAGACCACTGTGGACT	
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT'	секвенирование
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	
CRTISO rt F	ATGAAGCGAAGAAAGAGGTTGT	qRT-PCR
CRTISO rt R	GCAAGGTATCGTCTGTGGGTCT	qRT-PCR
CRTISO-L1 rt F	TCAAGGAGCCCTTGGTGCTA	qRT-PCR
CRTISO-L1 rt R	GGAGATCCAGCCAATTTTCGTAT	qRT-PCR
CRTISO-L2 rt F	TTCATCATTCACGCCTCGTC	qRT-PCR
CRTISO-L2 rt R	CATGAACTCGCAGAACTTGTCG	qRT-PCR
CrtISO tangerine 3183 F	ACATTACTCCGCGTCCGTGGA	Анализ мутаций tangerine 3183 и mic
CrtISO tangerine mic F	AGAGTGGAGAGCTATGGCAGTA	
CrtISO tangerine mic R	TACTGCCATAGCTCTCCACTCT	
CaPSY1F	TCAGAATGTCTGTTGCCTTG	амплификация гена
CaPSY1R	TCCTGATTTTCATGTTCTTGTAGA	
<i>PSYI-F</i>	GTGAAGAGACAGCTGAGATCG	qRT-PCR
<i>PSYI-R</i>	TCTCCGGAGTCATTAGCATCG	

<i>NCED1 in F1</i>	ACTATTAATTTGTAGGAAAGA	амплификация промотора и гена	
<i>NCED1 in F2</i>	ATGGGTCATTTGTTGTATTAGT		
<i>NCED1 in F3</i>	TTAGATGCTGTAGAAAGTGCTT		
<i>NCED1rtF</i>	TGC TCT TAG CTA CGA TGT GAT	qRT-PCR	
<i>NCED1rtR</i>	GCGAAATCATGCATCATTGTT GG		
<i>NCED2 in F1</i>	AGTAGTGCATAGCATATATGCA	амплификация промотора и гена	
<i>NCED2 in F2</i>	ACCACCACGTGCTCTTCTCT		
<i>NCED2 in F3</i>	ACGGTGACGGCATGGTTCAT		
<i>NCED2rtF</i>	TAT GCC CGT GGA GTT TTC GG	qRT-PCR	
<i>NCED2rtR</i>	GTT TGA AGA TCG CCA GAA GGC AA		
prRIN-F	TTGACTAGGGAACCATTAGAT	амплификация гена и секвенирование	
prRIN-R	ATATTGCCATACTCTTCTTGACAAT		
tRIN_F4	TTGACTAGGGAACCATTAGAT		
tRIN_F5	TTGAAGATTAGAAATGTCATATCGC		
tRIN_F6	GATTAGAGAGGCAAGTAGTACT		
tRIN_F7	GGTGAATTATAATTACCATGACC		
tRIN_F8	CTCGAGGGAGTAATTAAGTAG		
tRIN_F9	AACACATTCTTGATCAACTTGC		
tRIN_F10	TCAGTGTAACCTCACAAGTAG		
tRINex3F	AACTACCAAGAGTATTTGAAGCTT		
tRINin3R	GAAATAGTAACTCTAGGCAAC		
tRINin2R	CATGCTTGAATATTGAGGAAG		
tRIN_R4	ACAACATATACGATCACAGATAC		
tRIN_R5	CCTAGATCATATGTTTGTTC		
tRIN_R6	AAGACTACAAGATACCATGATCA		
mads-rinrtf	AAACATCATGGCATTGTGGTGAGC		qRT-PCR
mads-rinrtr	GGTTGTACATTATCGTATCCGTAAC		

Геномную ДНК выделили из молодых листьев каждого вида согласно Puchooa et al., 2004, (Кулакова и др., 2022), с дополнительной двойной депротенизацией фенол/хлороформом, и использовали в качестве матрицы (100 нг) для ПЦР при следующих условиях: для *PSY1* начальная денатурация при 94°C в течение 10 минут, 35 циклов денатурация при 94°C в течение 30 с, отжиг праймеров при определенной для каждого праймера температуре в течение 45 с, элонгация при 65°C в течение 2-4,5 минут, финальная элонгация при 65°C в течение 10 минут. Амплифицированные продукты ПЦР определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Фрагменты очищали с использованием набора QIAEX® II («QIAGEN», Германия). Полученные продукты ПЦР реакции были клонированы с использованием системы Qiagen cloning plus kit («Qiagen», Нидерланды) в векторе pDrive Cloning Vector согласно инструкции производителя. Для трансформации использовались QIAGEN EZ Competent Cells (Германия).

### **Структурный и филогенетический анализ**

Выравнивание последовательностей, структурный и филогенетический анализ генов и кодируемых ими белков были выполнены с помощью программы MEGA 7.0. ([megasoftware.net](http://megasoftware.net)) (Kumar, 2016). Филогенетические дендрограммы были построены на основе кДНК и белков с использованием методов Neighborhood-Joining и Jukes-Cantor; достоверность оценивали по значениям коэффициентов bootstrap для 1000 построений.

Предсказанные белки характеризовали по молекулярной массе, изоэлектрической точке (pI). Вторичную, третичную и четвертичную структуры предсказывали с помощью программы PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Визуализировали в программе Chimera-1.11.2 (<https://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/chimera.html>). Функционально значимые замены аминокислотных остатков предсказывали в программе PROVEAN (<http://provean.jcvi.org>). Консервативные домены, сайты и мотивы анализировали в NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>); UniProt (<https://www.uniprot.org>) и программе MEME 5.1.1 ([meme-suite.org](http://meme-suite.org)).

Поиск специфических цис-элементов в промоторах и 5'-UTR области (~ 2,0 т.п.н. выше иницирующего кодона) выполняли с использованием базы данных PlantCARE ([ugent.be](http://ugent.be)) и PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>). Визуализация цис-активных элементов проводилась в программе PLANTPAN 3.0. ([ncku.edu.tw](http://ncku.edu.tw)).

### **Выделение РНК и синтез кДНК**

Тотальную РНК выделяли из молодых и созревших бутонов, цветков, незрелых и созревших плодов (2-4 стадии развития плода), листьев шести видов томата с помощью

набора реактивов SV Total RNA Isolation System («Promega», США) с дополнительной ДНКазной обработкой согласно методике производителя.

Препараты кДНК для проведения РВ-ПЦР- синтезировали с помощью набора GoScript Reverse Transcription System («Promega», США), согласно методике производителя. Концентрации кДНК и РНК определяли на флуориметре Qubit 4 с помощью соответствующих реактивов («Invitrogen», США). Дополнительно качество РНК проверялось путем электрофореза в 1% агарозном геле.

Экспрессионный анализ выполняли методом количественной ПЦР в реальном времени (qРВ-ПЦР\РВ-ПЦР) Для анализа экспрессии исследуемых генов биосинтеза каротиноидов была подобрана система праймеров к целевым и референсным генам. В качестве референсных генов использовали гены *Expressed* и *Quactin* (Expósito-Rodríguez et al., 2008). Экспрессию генов биосинтеза каротиноидов в различных видах и сортах томата определяли на различных стадиях онтогенеза РВ-ПЦР с использованием набора «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» («Синтол», Россия) на термоциклере CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad Laboratories», США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах. Для анализа экспрессии использовался следующий протокол: первый цикл – 5 мин. при 95°C; последующие 40 циклов – 15 сек. при 95°C, 30 сек. 60°C. Измерение кривых плавления происходило при увеличении температуры от 55°C до 95°C с шагом 0,5°C в течение 5 сек. с последующим чтением результатов.

***In silico* анализ экспрессии** генов определяли на основании базы данных TomExpress в тканях томата *S. lycopersicum* сорта Heinz1706 и *S. pimpinellifolium* LA1589 (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/> и SGN-TEA <https://tea.solgenomics.net>).

Относительную экспрессию генов рассчитывали методом 2– $\Delta\Delta C_t$ . Построение графиков, оценку статистической значимости различий экспрессии в различных органах каждого исследуемого вида томата и корреляционные анализы проводили в программе GraphPad Prism v. 8.02 (<https://www.graphpad.com>), и с помощью t-теста с коррекцией Велча (Unpaired t-test with Welch's correction).

### **Содержание каротиноидов и хлорофилла спектрофотометрии и HPLC**

Биохимический анализ содержания (мг/г сырого веса) хлорофиллов (а и б), ликопина,  $\beta$ -каротина и общего количества каротиноидов (х + с; каротины + ксантофиллы, а также проликопин и ликопин) в листьях и плодах в динамике созревания всех анализируемых образцов томата проводили с использованием модифицированного протокола метода Фолча (2:1 хлороформ-метанол (V/V) в присутствии следовых

количеств  $Mg_2CO_3$ ) по стандартной методике (Folch et al., 1957). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах Eppendorf BioSpectrometer® basic («Eppendorf», Германия). Содержание ликопина и  $\beta$ -каротина измеряли в ацетон-гексановых растворах. Для расчета содержания хлорофиллов (а и б), ликопина,  $\beta$ -каротина и общих каротиноидов использовали следующие уравнения:

$$\text{Хлорофилл а (мкг/мл)} = 11,47 (A666 - A750) - 2 (A648 - A750)$$

$$\text{Хлорофилл б (мкг/мл)} = 21,85 (A648 - A750) - 4,53 (A666 - A750)$$

$$\text{Сумма каротиноидов (x + c) (мкг/мл)} = [1000 (A480 - A750) - 1,33 \text{ Chl а} - 23,93 \text{ Chl б}] / 202$$

$$\text{Ликопин (мг/100 мл)} = 0,204 A645 - 0,0458 A663 + 0,372 A505 - 0,0806 A453$$

$$\beta\text{-каротин (мг/100 мл)} = 0,216 A663 - 1,22 A645 - 0,304 A505 + 0,452 A453$$

где A666, A648, A750, A663, A645, A505, A453 и A480 — значения абсорбции при указанных длины волн; x + c — сумма ксантофиллов и каротинов.

Дополнительный анализ содержания каротиноидов у образцов томата проводили с помощью HPLC системы Shimadzu (Shimadzu, Киото, Япония) при 22°C, по стандартной методике (Pashkovskiy et al., 2021) на базе ФИЦ ПНЦБИ РАН. Разделение проводили на колонке с обращенной фазой Agilent Zorbax SB-C18 (5 мкм 4.6 × 250 мм) (Agilent, Санта Клара, США) со скоростью подачи растворителей 1 мл/мин. Каротиноиды из растертых в жидком азоте образцов (200мг) экстрагировали смесью гексан-ацетон (1:1, по объему); центрифугировали и супернатант сохраняли. Остаток дополнительно экстрагировали до полного удаления окраски; все супернатанты объединяли. Пигменты затем переносили в петролейный эфир, промывали MQ и концентрировали в ротационном испарителе при температуре не выше 35°C.

Каротиноиды идентифицировали по их времени удержания и спектрам поглощения. Количественное определение каждого каротиноида выполняли путем сравнения площади его пика в области 270–800 нм с суммой всех пиков каротиноидов, взятых за 100%, и рассчитывали с помощью программы LC-solution (“Shimadzu”, Kyoto, Japan) с использованием молярных коэффициентов экстинкции. В образцах томата дополнительно промеряли концентрацию суммы каротиноидов (x + c) в 100% петролейном эфире. Концентрацию каждого каротиноида (мкг/г сырого веса) рассчитывали, сопоставляя данные по сумме каротиноидов и процентному (моль %) соотношению отдельных типов каротиноидов.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Первым этапом работы было проведение биохимического анализа и определение содержания общих каротиноидов, ликопина,  $\beta$ -каротина в исследуемых образцах томатов секции *Lycopersicon* рода *Solanum*.

Для проведения биохимического анализа были выбраны 40 образцов, включая сорта *S. lycopersicum* с различной окраской зрелого плода и образцы дикорастущих видов (*S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. arcanum*, *S. peruvianum*) (табл.2.1).

Так как каротиноиды синтезируются в листьях и участвуют в процессе фотосинтеза, являясь антиоксидантами, а также накапливаются в плодах, то содержание общих каротиноидов, ликопина и  $\beta$ -каротина оценивалось в листьях, а также в процессе созревания плодов и в спелых плодах.

#### 3.1.1. Сравнительное содержание общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в листьях

Для оценки содержания каротиноидов были взяты листья (5-10 дней после опыления/начала плодоношения) одного яруса анализируемых образцов 10 видов, включающих красноплодные (*S. lycopersicum* сорт Heinz *S. pimpinellifolium* VIR1018), желтоплодные (*S. cheesmaniae* LA0421) и зеленоплодные виды (*S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. peruvianum*, *S. arcanum*). Содержание общих каротиноидов в листьях было определено методом Фолча (рис. 3.1.1.).

Как видно из рисунка 3.1.1, содержание каротиноидов в листьях и красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видов составляло от 156 мкг/г сырого веса (*S. habrochaites*) до 268 мкг/г (*S. pennellii*) у зеленоплодных видов и от 239 мкг/г (*S. pimpinellifolium*) до 307 мкг/г (*S. lycopersicum*) у красноплодных. Полученные результаты в целом согласуются с ранее опубликованными данными по оценке суммарного содержания каротиноидов в листьях представителей различных секций рода *Solanum* (*S. tovrum*, *S. melongena*, *S. sisimbrifolium*), где было показано, что содержание каротиноидов в листьях варьировалось в широких пределах от 27 мкг/г до 370 мкг/г сырой массы (Islam et al., 2018).

Был проведен более детальный HPLC анализ состава каротиноидов в листе у образцов *S. lycopersicum* и *S. pennellii* и показано, что преобладающими пигментом являются лютеин (184 мкг/г, 60%),  $\beta$ -криптоксантин (67.7 мкг/г, 22%) и виолаксантин (39.

мкг/г, 13%), что совпадает с ранее полученными данными по составу каротиноидов в листовых пластинах томата (Mi et al., 2022) и с тем, что именно эти каротиноиды являются основными в фотосинтезирующей ткани растений (Affek, Yakir, 2002; Saini et al., 2015; Dias et al., 2021).

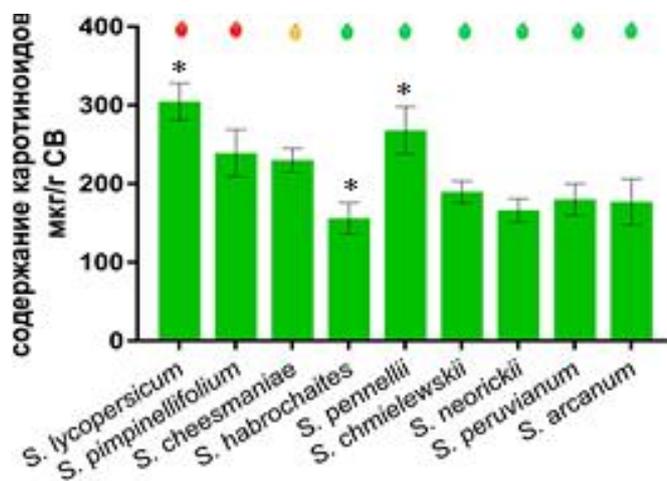


Рисунок 3.1.1 – Содержание общих каротиноидов в листьях видов томата секции *Lycopersicon*. Звездочками указаны достоверные отличия. Над графиком отмечен цвет зрелых плодов.

Таким образом, количество общих каротиноидов и соотношение различных классов каротиноидов в листьях относительно постоянно как в эволюционно более молодых красноплодных и желтоплодных видах, так и в эволюционно более древних зеленоплодных видах *Solanum* секции *Lycopersicon*, из чего можно предположить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях.

### 3.1.2. Сравнительное содержание общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в процессе созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата

Также интересно было оценить содержание общих каротиноидов у красноплодных и зеленоплодных видов томата в процессе созревания плодов. Для оценки содержания были взяты образцы плода (сектор плода, включающий эндокарп, мезокарп, перикарп) на стадиях Immature Green (IG) – созревающий плод (~18-23 дня после опыления), Mature Green (MG) – плод максимального размера с зеленой окраской, Red Ripe (RR) – плод биологической спелости, полностью окрашенный и мягкий для красноплодных видов и Fully Ripe (FR) – плод биологической спелости мягкий зеленоплодного вида. Так как стадию Breaker (Br)- стадию покраснения плода у дикорастущих зеленоплодных видов было тяжело определить, она была исключена из анализа. Качественный и

количественный состав каротиноидов определялся методом Фолча и HPLC; расчёты велись на грамм сырого веса.

Как следует из рисунка 3.1.2 для всех анализируемых образцов и зеленоплодных, и красноплодных видов была характерна общая тенденция низкого количества каротиноидов на стадиях IG и MG с повышением (небольшим для зеленоплодных и резким для красноплодных видов) на стадии RR/FR. Общее содержание каротиноидов в плодах диких зеленоплодных видов на стадии FR было низким (10-20 мкг/г). При этом, исходя из данных HPLC, как на стадии IG, так и на стадии MG основными каротиноидами зеленоплодных и красноплодных видов были лютеин (IG-6 мкг/г, 38%; MG- 14.8 мкг/г, 62%),  $\beta$ -криптоксантин (IG-3.7 мкг/г, 23%; MG- 7.4 мкг/г, 31%) и виолаксантин (IG-3.7 мкг/г, 38%; MG- 1.3 мкг/г, 5%). На стадии RR у красноплодных видов лютеин в плодах составлял менее 1%, а ксантофиллы не детектировались. Таким образом, для всех анализируемых видов томата на стадии IG и MG детектировалось минимальное содержание общих каротиноидов, а их состав соответствовал таковому в фотосинтезирующих тканях.

В плодах у зеленоплодных видов в целом общее содержание каротиноидов было низким: составляло 10 мкг/г на стадии IG и MG и возросло в два раза, до 20 мкг/г на стадии RF, что в 25–30 раз меньше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae*. Плоды зеленоплодных видов накапливали  $\beta$ -каротин, но в низких концентрациях на стадиях MG и FR - 1 мкг/г и 20 мкг/г соответственно. Ликопин в плодах этих видов не детектировался.

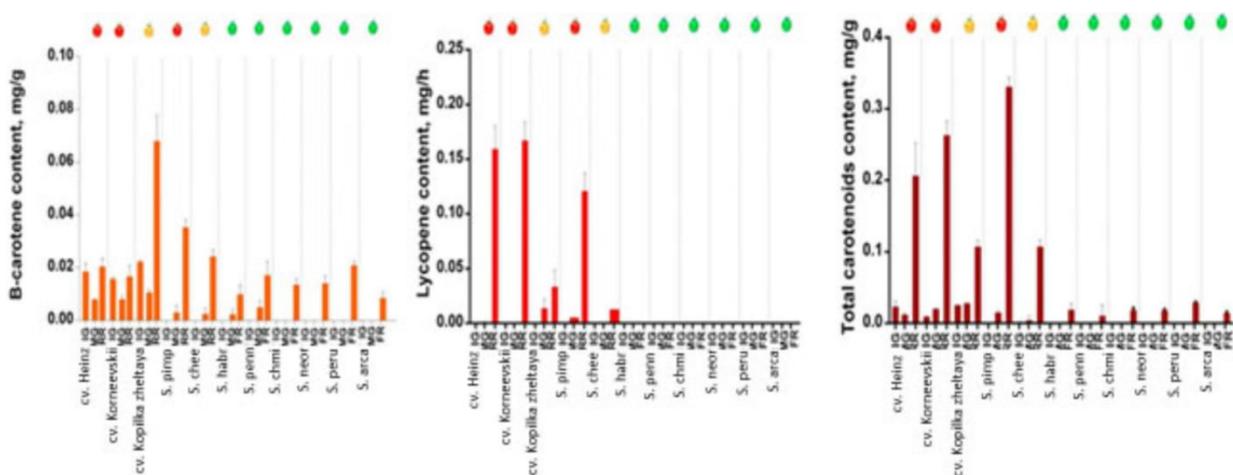


Рисунок 3.1.2 – Содержание ликопина,  $\beta$ -каротина и общих каротиноидов в зрелых зеленых плодах (MG) и спелых плодах (RR/FR) в образцах красно-, желтоплодных сортов и видов (*S. lycopersicum* (сорта Heinz, Корнеевский, Копилка желтая), *S. pimpinellifolium* VIR1018, *S. cheesmaniae* LA0421 и зеленоплодных видов *S. habrochaites* LA2144, *S. pennellii* LA0716, *S. chmielewskii* LA2663, *S. neorickii* LA2133, *S. peruvianum* LA1954, *S. arcanum* LA2157) плодах на стадии MG и FR. Цвет плодов указан сверху.

Максимальное количество общих каротиноидов наблюдалось на стадии FR у образца *S. peruvianum* (21 мкг/г), тогда как минимальная концентрация  $\beta$ -каротина и общих каротиноидов были показаны для стадии FR у видов *S. habrochaites* и *S. neorickii* (12 мкг/г). Таким образом, в плодах диких зеленоплодных видов содержание общих каротиноидов было крайне низким: плоды на ранних стадиях созревания содержали лютеин и ксантофиллы, а на стадии полного созревания содержание общих каротиноидов практически равнялось содержанию  $\beta$ -каротина, что связано с минимальным накоплением других каротиноидов и отсутствием ликопина.

У образца желтоплодного дикорастущего вида *S. cheesmaniae* содержание общих каротиноидов и  $\beta$ -каротина изменялось в 7 и 10 раз с 10 мкг/г до 100 мкг/г и с 10 мкг/г до 70 мкг/г на стадиях MG и FR соответственно (рис. 3.1.2). Также, как и в случае зеленоплодных видов в целом повышение содержания общих каротиноидов к стадии FR проходило за счет синтеза  $\beta$ -каротина. При этом, как было показано, происходит также накопление других каротиноидов, прежде всего лютеина (включая лютеоксантин и лютеинэпоксид).

Красноплодные виды были представлены образцом дикорастущего вида *S. pimpinellifolium* VIR1081 и тремя сортами *S. lycopersicum* (Heinz, Корнеевский, Копилка желтая). Оба вида характеризовались резким повышением синтеза общих каротиноидов и прежде всего ликопина по мере созревания плода. Содержание ликопина у *S. pimpinellifolium* было 140 мкг/г на стадии RR, что в 46.6 раза выше, чем на стадии MG (3 мкг/г), тогда как у сорта Heinz содержание возрастало в 13 раз с 24 мкг/г на стадии MG до 109 мкг/г на стадии RR. Содержание ликопина у сортов *S. lycopersicum* возросло в 100 раз (с 14 мкг/г до 140 мкг/г) в процессе роста с стадии MG к стадии RR.

Два красноплодных сорта *S. lycopersicum* Heinz и Корнеевский различались содержанием  $\beta$ -каротина. Содержание  $\beta$ -каротина у красноплодных сортов возросло в 2-2,5 раза с 7 мкг/г на стадии MG до 14-20 мкг/г, тогда как у желтоплодного сорта содержание  $\beta$ -каротина увеличилось в 10 раз с 6 мкг/г на стадии MG до 60 мкг/г на стадии RR. При этом интересно, что общее содержание каротиноидов у *S. pimpinellifolium* (340 мкг/г) выше, чем у красноплодных сортов Heinz (230 мкг/г) и Корнеевский (250 мкг/г). Данные HPLC показали, что во время созревания плодов общее количество каротиноидов у *S. lycopersicum* и *S. pimpinellifolium* увеличилось с 10 мкг/г сырой массы до 300 мкг/г сырой массы. При этом не накапливались бесцветные каротиноиды (фитоен и фитофлуен). Такая динамика изменения состава и содержания каротиноидов по мере созревания плода томата с резким увеличением синтеза каротиноидов к стадии RR/FR была показана и

ранее для других красноплодных образцов и зеленоплодного *S. pennelli* (Bolger et al., 2014; Kilambi et al., 2017). При этом полученные данные не подтвердили снижение синтеза  $\beta$ -каротина от стадии IG к RR, показанного ранее (Bramley, 2002). Наоборот, и у красноплодных, и особенно у зеленоплодных видов наблюдалось значительное увеличение синтеза данного пигмента.

### 3.1.3. Оценка содержания общих каротиноидов, ликопина и $\beta$ -каротина в сортах *S. lycopersicum* с различной окраской зрелого плода

В анализ были взяты 32 образца (сорта и селекционные линии) *S. lycopersicum* с различной окраской плода: два сорта с бледной окраской; 8 сортов с желто-оранжевой окраской и 22 сорта с красной и темно-красной окраской плодов (рис. 3.1.3). Были выбраны отечественные сорта и перспективные линии, а также сорта зарубежной селекции из коллекции ФНЦО, наиболее часто использующиеся в скрещиваниях.

Общее содержание каротиноидов в анализируемых сортах варьировало от 1.02 мкг/г до 200 мкг/г сырого веса. Согласно полученным данным, наибольшее количество суммы каротиноидов детектировалось у сортов с темно окрашенными плодами (Земба (270 мкг/г), Black Cherry (235 мкг/г), Black Jack (557 мкг/г см)).

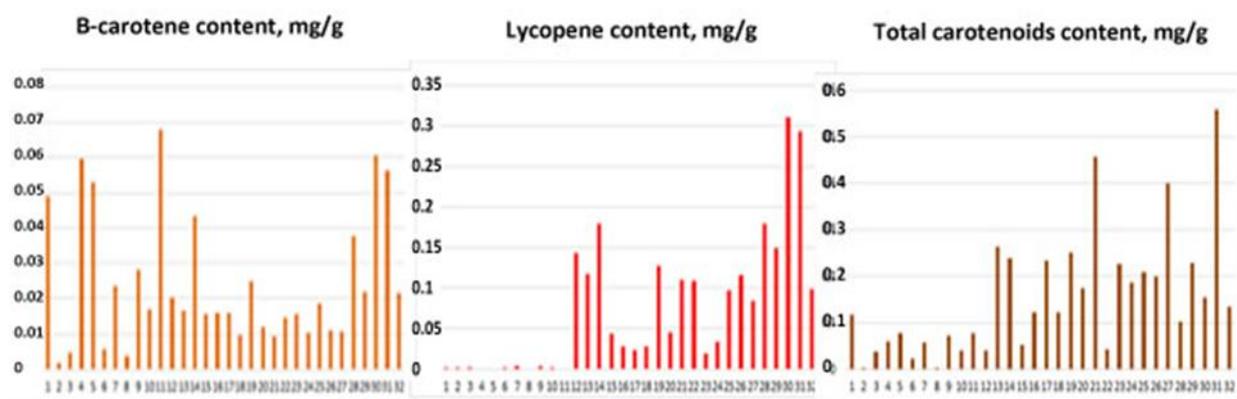


Рисунок 3.1.3 – Содержание  $\beta$ -каротин, ликопина и общих каротиноидов в спелых плодах анализируемых образцов томата: Линия Несозревающий (1), “White beauty” (2), Линия Черри лимонно-желтые (3), Линия Черри желто-оранжевые (4), Линия Черри оранжевые (5), Викинг (6), Линия Золотой лотос (7), “Yellow Peach” (8), “Жидкова” (9), “Big Rainbow” (10), “Long John” (11), “Грот” (12), “Благодатный” (13), “Лотос” (14), “Подарок к юбилею” (15), “Малиновый силач” (16), “Гаяна” (17), “Гармошка” (18), “Русский размер” (19), “Дубок” (20), Линия 411 (21), Линия Черри розовые (22), Линия Черри арбуз (23), Линия 176 (24), Линия Черри коричнево-фиолетовые (25), “Земба” (26), “Black Cherry” (27), “Black Jack” (28), “Paul Robson” (29). Значения концентрации (мг/г сырого веса) представлены как среднее арифметическое 2 биологических и 3 технических повторностей.

Оценка содержания ликопина также показала высокую изменчивость (рис.3.1.3). Так зрелые плоды с бледно-зеленой и желто-оранжевой окраской характеризовались следовыми количествами ликопина (Л-Черри лимонно-желтые, Черри желто-оранжевые, Черри оранжевые, Викинг, Л-Золотой лотос, Yellow Peach, Жидкова, Копилка жёлтая, Big Rainbow), или совсем не содержали его (Л-Несозревающий, White beauty), что сопоставимо с ранее полученными данными (Yazdani et al., 2019; Lenucci et al., 2009; Flores et al., 2017; Li et al., 2013). Плоды с красной окраской характеризовались относительно высоким содержанием ликопина – от 20 мкг/г (сорт Дубок со светло красной окраской плода) до 163 мкг/г у сортов с ярко-красной окраской (Long John). Содержание ликопина было еще выше в сортах с темной-красной и бордовой окраской плода ((Земба (148 мкг/г), Black Cherry (205 мкг/г), Black Jack (322 мкг/г)). Полученные значения по содержанию ликопина в плодах томата совпадали с тем, что для большинства современных сортов содержание ликопина находится в интервале 60-160 мкг/г сырого веса (Karniel et. al, 2020).

Как и ожидалось наибольшее содержание  $\beta$ -каротина было обнаружено в спелых плодах желтоплодных образцов (Черри желто-оранжевые, Черри оранжевые) 59 мкг/г, 49 мкг/г соответственно. Согласно литературным данным, у зелено- и желтоплодных видов в зрелых плодах обнаруживался преимущественно лютеин (60–81% от общего содержания каротиноидов) и  $\beta$ -каротин (11–39% от общего содержания каротиноидов (Meléndez-Martínez et al., 2010). Содержание  $\beta$ -каротина в красноплодных сортах было ниже, в сравнении с желтоплодными и составляло (12.1–18.5 мкг/г сырого веса), за исключением образцов с темно-красной окраской плодов (линия Черри коричнево-фиолетовые, Земба, Black Cherry, Black Jack, Paul Robson), у которых содержание  $\beta$ -каротина было достаточно высокое и составляло 20-60 мкг/г сырого веса.

В целом полученные значения по содержанию и составу каротиноидов в спелых плодах соответствовали значениям, полученным ранее (Yazdani et al., 2019; Lenucci et al., 2009; Flores et al., 2017; Li et al., 2013). Так при анализе 12 красноплодных сортов венгерской селекции общее содержание каротиноидов составило 62.7-88.3 мкг/г сырого веса при содержании ликопина 51.8-72.2 мкг/г и  $\beta$ -каротина 2.85-6.17 мкг/г.

Таким образом, в результате проведенного биохимического анализа показано, что качественный и количественный состав каротиноидов в листьях эволюционно более молодых красноплодных и желтоплодных видов и у более древних зеленоплодных видов значимо не отличается ни по составу, ни по содержанию каротиноидов, что позволяет заключить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях.

В процессе созревания плодов зеленоплодные виды томата образовывали лютеин и ксантофиллы, содержание и состав которых был 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. Основным каротиноидом в плодах диких зеленоплодных видов является каротин, ликопин не детектируется. Созревание плодов красноплодных видов томата характеризовались резким увеличением синтеза общих каротиноидов и прежде всего за счет синтеза и накопления ликопина на стадии полного созревания.

Таким образом, в результате биохимического анализа было показано:

- Качественный и количественный состав каротиноидов в листьях относительно постоянен в красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видах *Solanum* секции *Lycopersicon*. Можно заключить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях.
- При созревании плодов у диких зеленоплодных видов содержание каротиноидов возрастает, но не значительно. Состав каротиноидов сопоставим с таковым в листьях. Ликопин не детектируется. Основным каротиноидом в плодах диких зеленоплодных видов являлся  $\beta$ -каротин.
- Красноплодные виды характеризуются резким увеличением синтеза общих каротиноидов, что в основном связано с синтезом и накоплением ликопина. Синтез  $\beta$ -каротина также несколько повышен, в сравнении с образцами зеленоплодных видов. Известно, что синтез и накопление каротиноидов в плодах красноплодных видов, помимо антиоксидантной и участия в фотосинтезе, связан с возникновением новой функции привлечения распространителей семян. Таким образом, возникновение у красноплодных видов генов - регуляторов каротиногенеза (например, белка Orange) и их способность к большему накоплению каротиноидов, дала им эволюционное преимущество.

### **3.2. Определение генов-гомологов фитоенсинтазы PSY1 у сортов и видов *Solanum* секции *Lycopersicon***

Первым и одним из ключевых этапов биосинтеза каротиноидов является образование 15-цис-фитоена, катализируемое фитоенсинтазой PSY (рис 1.3). PSY является ключевым ферментом, и его потеря блокирует синтез каротиноидов во время созревания плодов, тогда как сверхэкспрессия его увеличивает (Ducroux et al., 2005; Chen et al., 2019). В геноме *S. lycopersicum* известны три паралогичных гена *PSY*, кодирующие высоко гомологичные белки, которые различаются по органоспецифичной экспрессии (Giorgio et al., 2008). У томата именно

транскрипция гена *PSY1* обеспечивает синтез каротиноидов в динамике созревания плодов, в то время как экспрессия *PSY2* характерна для фотосинтетической ткани (Giorio et al., 2008). В связи с тем, что изучение гена фитоенсинтазы *PSY1* преимущественно проводилось на красноплодных видах и сортах, представлялось интересным определение генов-гомологов *PSY1* также у желтоплодных и зеленоплодных видов *Solanum* секции *Lycopersicon*, а также сортов и различной окраской спелого плода.

Первым этапом работы стала разработка праймеров для идентификации (амплификации, клонирования, секвенирования) и экспрессионного анализа гена *PSY1* новых генов-гомологов видов и сортов томата. Для этого были использованы полногеномные последовательности томата *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (GCA\_000188115.4), *S. pennellii* (GCA\_001406875.2) и картофеля *S. tuberosum* (GCA\_000226075.1), доступные в базе данных NCBI. Были разработаны праймеры как для амплификации всей кодирующей последовательности гена, так и внутренние праймеры для секвенирования, а также для амплификации и секвенирования регуляторных областей у генов-гомологов (табл. 2.2). С использованием праймеров PSY1geneF и PSY1geneR получены амплификаты размером ~6 т.п.н., что совпадало с ожидаемым размером гена.

Амплифицированные фрагменты генов-гомологов *PSY1* 22 образцов томата были клонированы в плазмиду pGEM-T (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega USA) и не менее двух клонов каждого гена-гомолога были секвенированы с использованием разработанных праймеров к внутренним фрагментам (tPSY\_F6- tPSY\_F9) (табл. 2.2) и стандартных праймеров M13F и M13R. Характеристика полученных последовательностей приведена в табл.3.1.1. Полученные последовательности новых генов-гомологов *PSY1* видов томата депонированы в генбанк NCBI (табл. 3.1.1).

### 3.2.1. Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных генов *PSY1* у сортов и видов *Solanum* секции *Lycopersicon*

Был проведен экзон-интронный анализ полученных последовательностей генов-гомологов *PSY1* у образцов 9 видов и 12 сортов томата. Идентифицированные кодирующие последовательности гена *SlPSY1* у исследуемых 12 сортов культурного томата *S. lycopersicon* имели одинаковую длину – 1239 пн., что соответствует белку 412 а.к. (табл.3.1.1). Общий уровень межсортового полиморфизма кодирующих последовательностей составил 3.87%. В составе нуклеотидных последовательностей выявлено 48 SNPs, индели отсутствовали. Наибольшее число нуклеотидных замен выявлено в экзоне I (22 SNPs), в то время как самый короткий экзон II был инвариантен. В

экзонах III и VI выявлено по 6 полиморфных сайтов; в экзонах IV и V – по 10 и 4 SNPs соответственно (табл. 3.1.1).

Всего у сортов определено 16 аллельных вариантов. Для некоторых сортов (Корнеевский, Zemba, Black Jack, NN25) выявлено наличие двух аллельных вариантов *PSYI*, соответствующих двум аллелям диплоидного генома. Для сортов Heinz и Малиновый силач найден одинаковый аллель; каждый из оставшихся сортов имел свойственный только ему аллельный вариант (рис. 3.2.1).

Таблица 3.2.1. Характеристика последовательности генов - гомологов *PSYI* у анализируемых сортов и видов томата и перца

Вид	Сорт/TG RC номер	Окраска спелого плода	NCBI Gene ID/Solyc No.	Длина гена, п.о	Длина кодирующей части, п.о.	Длина белка, а.к.	Изоэлектрическая точка, рI	Молекулярная масса, кДа
<i>PSYI</i> гены идентифицированные в исследовании								
<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz 1706	LA4345	Красный	MT664042	4,871	1,239	412	8.1	46.6
<i>S. pimpinellifolium</i>	LA1589	Красный		4,872	1,239	412	8.1	46.6
<i>S. cheesmaniae</i>	LA0421	Желтый	MN782521 MN782522	4,883 / 4,876	1,239	412	7.74 7.9	46.6/ 45.5
<i>S. chilense</i>	LA1963	Зеленый	MN782523 MN812838	4,858 4,840	1,239	412	7.74/ 7.29	46.6/ 46.3
	LA2884		MN782524 MN782525	4,878 4,876	1,239	412	7.93/ 7.90	46.5/ 46.5
<i>S. habrochaites</i>	LA1771	Зеленый	MN782526 MN782527	4,914 4,916	1,239	412	8.24 8.00	46.6 46.5
	LA2144		MN782528 MN782529	4,906 4,903	1,239	412	8.1 7.96	46.6 46.7
<i>S. pennellii</i>	LA1926	Зеленый	MN782530 MN782531	4,898 4,901	1,239	412	8.5 8.1	46.7 46.6
	LA0716		MN782532	4,886	1,239	412	8.1	46.5
<i>S. peruvianum</i>	LA1954	Зеленый		4,899	1,239	412	7,98	46,5
<i>S. chmielewskii</i>	LA2663	Зеленый		4,900	1,239	412	8,2	46,6
<i>S. neorickii</i>	LA2133	Зеленый		4,870	1,239	412	7,9	46,7
<i>S. arcanum</i>	LA2157	Зеленый		4,885	1,239	412	8,4	46,4
<i>S. lycopersicum</i>	cv. Heinz (ФНЦО)	Красный		4872	1,239	412	8,3	46.6
	cv. Корнеевский	Красный		4870	1,239	412	8,1	46.6

cv. Garmoshk a	Красный		4873	1,239	412	7,99	46.6
cv. Malinovyi silach	Красный		4871	1,239	412	8,15	46.6
cv. Zemba	Красно- фиолетовы й		4873	1,239	412	8,4	46.6
cv. Paul Robeson	Красно- фиолетовы й		4871	1,239	412	8,1	46.6
cv. Black Jack	Красно- фиолетовы й		4872	1,239	412	8,1	46.6
cv. Christmas blueberry	Красно- фиолетовы й		4874	1,239	412	8,4	46.6
cv. Black cherry	Красно- фиолетовы й		4874	1,239	412	8,1	46.6
cv. Cherry zhelto- oranzhevy e	Желтый/ор анжевый		4873	1,239	412	8,2	46.6
cv. Kopilka zheltaya	Желтый		4872	1,239	412	8,1	46.6
cv. Nesozrev ayuschii (NN-25)	Светло желтый		4873	1,239	412	8,1	46.6

Проведенный сравнительный анализ показал, что окраска зрелого плода томата у образцов выборки сортов 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.



*Nicotiana*: в то время как для трех из четырех анализируемых видов была выявлена типичная шести-экзонная структура гена, у *PSY1 N. benthamiana* был найден дополнительный экзон (Wang et al., 2021). Во всех остальных известных случаях ген *PSY1* был шестиэкзонным. Длина кодирующей части варьировала от 900 (Mycena sanguinolenta) п.н до 1320 п.н (*N. tabacum*), что соответствует длине белка от 300 а.о до 440 а.о. (Wang et al., 2021; Lisboa et al., 2021). При этом для подавляющего большинства видов растений размер белка PSY1 составлял 408-412 а.о. (Wang et al., 2021; Lisboa et al., 2021). Для большинства видов растений в состав последовательности *PSY* генов, также как и у гомологов видов томата, входила нетранслируемая 5'-UTR последовательность, которая могла быть достаточно протяженной как у вида эвкалипта *Eucalyptus grandis* и сои *G. max*, либо очень короткой, как у однодольных (просо, сорго). Также у некоторых видов (например, у апельсина) ген *PSY1* был без 5'-UTR области (Lisboa et al., 2021).

По сравнению с геном *PSY1 S. lycopersicum* сорта Heinz изменчивость выявленных гомологичных генов *PSY1* у остальных восьми анализируемых видов томата составляла 14,0% для полногеномных последовательностей (700 SNPs в 4995 п.н.): 9,0% для экзонных (110 SNPs в 1239 п.н.) и 14,6% для интронных последовательностей (311 SNPs в 2117 п.н.). Вариабельность нетранслируемых областей 5'-UTR составила 18,6% (299 SNPs в 1639 п.н.). Всего в кодирующих последовательностях было выявлено 56 несинонимичных замен и обнаруживались они в основном у гомологов генов *PSY1* зеленоплодных видов томата (табл. 3.1.1, рис.3.2.2). 5'-UTR и экзон I были наиболее вариабельными.

Как и в случае гена *PSY1*, у красноплодных и зеленоплодных видов томата кодирующие последовательности *PSY1* других видов растений также характеризовались относительно высоким уровнем консерватизма (Welsch et al., 2008; Rodríguez-Villalón et al., 2009; Guzman et al., 2010; Qin et al., 2011; Flowerika et al., 2016; Sugiyama et al., 2017; Shao et al., 2018). Как и у последовательностей *PSY1* томата, большинство *PSY1* растений имеют длинный первый экзон (размер от 407 п.н. до 473 п.н.) и очень короткий второй экзон (порядка 50 п.н.). Размеры всех остальных экзонов *PSY1* томата мало отличались от таковых у большинства видов растений и составили 50, 173, 236, 199 и 184 п.н. (табл. 3.1.1) (Giorio et al., 2008; Lisboa et al., 2021).



### 3.2.2. Структурный анализ гомологов фитоенсинтазы *PSY1* у сортов и видов томата

Полученные нуклеотидные последовательности генов-гомологов *PSY1* видов томата были транслированы и изучена вариабельность соответствующих белковых последовательностей. Из 56 SNPs, выявленных в экзонах, в 31 приводили к замещению аминокислот, 12 из которых оказались радикальными согласно предсказанию программы PROVEAN. Общий уровень полиморфизма аминокислотных последовательностей составил 7.5%, что является достаточно высоким показателем для выборки образцов, состоящих из сортов и видов дикорастущего томата. Однако, определенных аминокислотных замен, сцепленных с окраской плода (красной, желтой, зеленой) выявлено не было.

Размер гомологов *PSY1* был одинаковым для всех исследованных видов томата и состоял из 412 аминокислот (а.о.) (табл. 3.1.1). Подобно белку *SIPSY1 S. lycopersicum*, предполагаемые гомологичные белки *PSY1* диких видов содержали консервативный домен фитоенсинтазы (НН)-IPPS (75–405 а.о., согласно NCBI-CDD или 130–412 а.о. согласно UniProt) и N-концевой домен или транзитный пептид (ТР) (1- 74 а.о. согласно NCBI-CDD или 1–129 а.о. согласно UniProt). Длина предсказанного N-концевого транзитного пептида у видов томата была достаточно протяженной 1- 74 а.о (согласно NCBI-CDD), но в целом соответствовала предыдущим результатам для *PSY1* арабидопсиса, томата и подсолнечника, ТР которых содержат 1–70, 1–62 и 1–67 остатков, соответственно (Ray et al., 1992; Bartley, Scolnik 1995; Zhang et al., 2009).

В проанализированных гомологичных белках *PSY1* дикорастущих томатов в сравнении с белком *SIPSY1* культивируемого *S. lycopersicum* (сорт Heinz 1706. было выявлено 56 аминокислотных замен (11,2% в 412 а.о.), из которых 27 (58,7%) были радикальными (рис. 3.2.2). Семь радикальных замен были обнаружены в транзитном пептиде желтоплодных и зеленоплодных видов: в образце *S. pennellii* LA0716 клон 1 (rR97G, rP106S, rL116S и rD122A); *S. chilense* LA2884 клонах 1 и 2 (rP106S), *S. cheesmaniae* LA0421 клон 2 (rE119G) *S. pennellii* LA1926 клон 2 (rD122A и rR123M) (рис. 3.2.2).

Все остальные 28 замен, включая 20 радикальных, были распределены неравномерно и располагались преимущественно в консервативном домене НН-IPPS и обнаруживались как у зеленоплодных, так и у желтоплодных видов. 19 аминокислотных замен, в том числе 16 радикальных, были детектированы в НН-IPPS домене *PSY1* зеленоплодных видов томата (рис. 3.2.2). Так у зеленоплодного вида *S. chilense* LA1963 были обнаружены следующие аминокислотные замены: (rR215G, rM217L, rK388E и

rA372D в клоне 2 и rA372D в клоне 1) у *S. chilense* LA2884: (rR296G и nI391T в клоне 1). У *S. habrochaites* LA1771 (nI150V, rE266G и nD287E в клоне 1) и у *S. habrochaites* LA2144 (rL281V в клоне 2). У *S. pennellii* LA1926 и LA0716 (rL200S, rD216G, rK227R, rC240W, rD311Y и rT346I в клоне 1; rT346I, rR179K и rI314M в клоне 2) (rD339G в клон 1) (рис. 3.2.2). Последовательность PSY1 желтоплодного вида *S. cheesmaniae* (LA 0421) содержала семь аминокислотных замен, как радикальных, так нейтральных (nN189D, rE235V, rV247A и rP394S в клоне 1 и nY171H, rY241D и nK328R в клоне 2) (рис. 3.2.2).

Для понимания изменчивости функционально важных участков был проведен анализ консервативных доменов в NCBI-CDD. Были идентифицированы функционально значимые сайты активного центра (131-YAKTF-135 и 381-RAYV-384), которые определяют конформацию активного центра, участки, богатые аспаратом необходимые для связывания субстрата с  $Mg^{2+}$  (161-DELVD-165 и 287-DVGED-291), и каталитические участки (K133, F135, Y154, P158, D161, D165, Y239, A244, V247, G248, S251, G276, N279, R286, D287, E290D291, R296, F354, P355 и S359) (рис. 3.2.3).

НН-IPPS домены двух красноплодных видов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*, отличались друг от друга только одним нейтральным замещением (nV360I). При этом в PSY1 *S. pimpinellifolium* VIR1081 отсутствовала нейтральная мутация nA408V, обнаруженная во всех проанализированных образцах *S. lycopersicum*. Остальные замены были специфичными для видов или образцов томата. Так, среди проанализированных видов у *S. pennellii* LA1926 НН-IPPS домен был наиболее полиморфным, а у *S. pennellii* LA0716 — наиболее полиморфным был транзитный пептид. Минимальные различия наблюдались между гомологами PSY1 красноплодных и желтоплодных видов. При этом мутации, обнаруженные среди анализируемых последовательностей PSY1, не были связаны с активными центрами, за исключением замены nD287E *S. habrochaites* LA1771 и rR296G *S. chilense* LA2884. Кроме того, все гомологи PSY1 содержали функционально важную мутацию Y136N, отсутствующую у других Пасленовых (рис. 3.2.3).

Помимо доменов с использованием программы MEME 7.0.26 были определены консервативные мотивы у идентифицированных гомологов PSY1 у зеленоплодных и красноплодных видов томата секции *Lycopersicon*, а также видов рода *Solanum* других секций представленных в NCBI, а также представителей родов *Capsicum* и *Lyium* сем. Solanaceae, которые также имеют сочные красные плоды (рис. 3.2.4).

<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	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	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	G	S	G	N	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	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	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	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	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	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	R	E	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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 3.2.3 – Функционально важные сайты в белке PSY1. Активный центр (131-ΥAKTF-135 и 381-RAYV384) выделен синим цветом, обогащенные аспаратом сайты связывания субстрата с Mg<sup>2+</sup> (161-DELVD-165 и 287-DVGED-291) — фиолетовым и дополнительные остатки, образующие активный центр выделены красным шрифтом. Положения аминокислот указаны в соответствии с PSY1 *S. lycopersicum* сорт Heinz. N136 (синий шрифт) - специфичная для видов томата замена Y136N (Efremov et al., 2020).

У анализируемых видов томата было выявлено 13 одинаковых консервативных мотивов в последовательности белков как красноплодных, так и зеленоплодных видов. Из этого следует, что виды томата, несмотря на различия в составе каротиноидов и, соответственно, окраске зрелого плода, не различались ни набором мотивов, ни их расположением в последовательности белка. Более того, такие же мотивы были детектированы и у PSY1 видов культурного и дикорастущего картофеля, имеющих спелые плоды зеленой окраски (рис. 3.2.4). Таким образом, у красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видов томата домены и мотивы, входящие в состав гомологов PSY1, сохраняются, что указывает на то, что в диких видах PSY1 представляет собой функционально правильный белок и его низкая активность у зеленоплодных видов связана с регуляцией экспрессии гена, а не с его последовательностью.

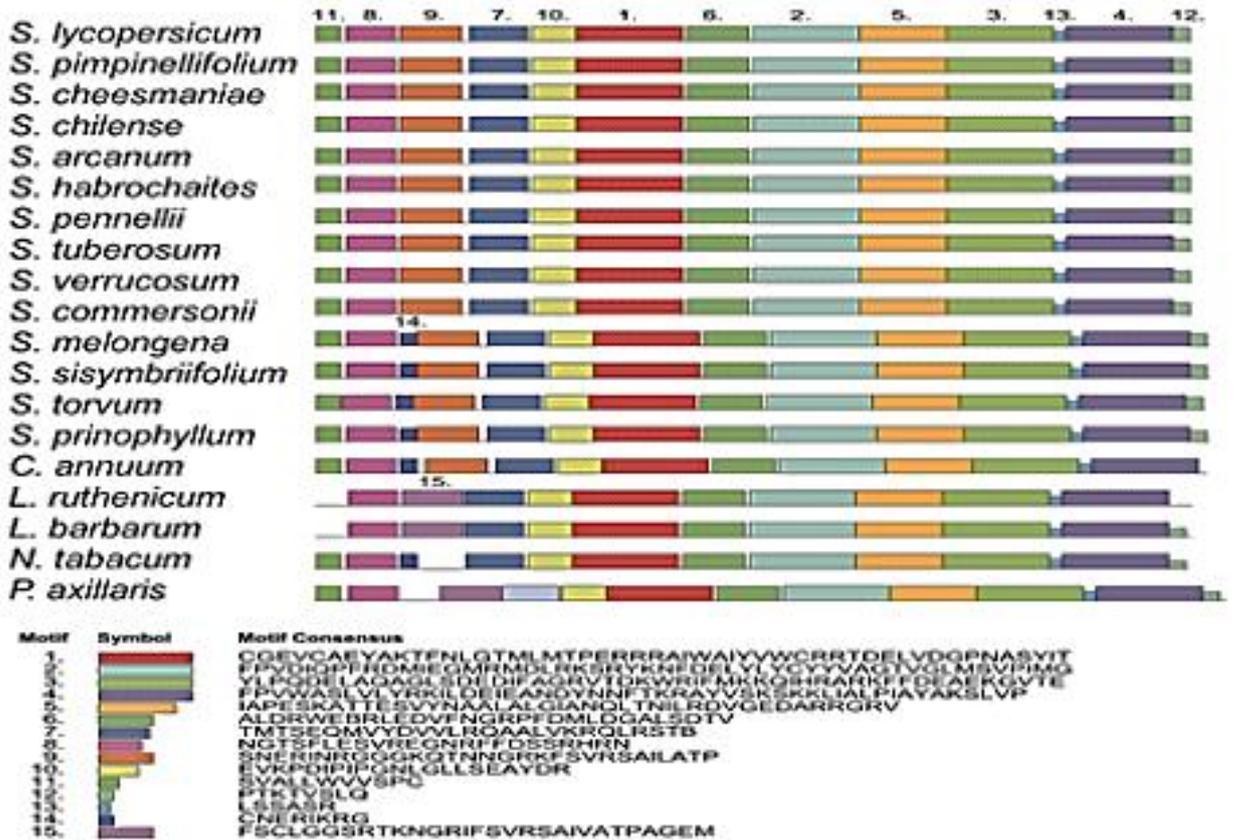


Рисунок 3.2.4 – Распределение консервативных мотивов у гомологов PSY1 видов томата и других видов Solanaceae (программа MEME 7.0.26).

*Пространственная структура гомологов PSY1 томатов.* Впервые была определена трехмерная (3D) структура гомологов PSY1 у двух видов томата (красноплодного *S. lycopersicum* и зеленоплодного *S. pennellii*), которая была предсказана с использованием программы Phyre2 на основе кристаллических структур родственных ферментов (каротиноиддегидрооксигенирующей, дегидрооксигенирующей, скваленсинтазы, фитоен/скваленсинтазы) (рис. 3.2.5).

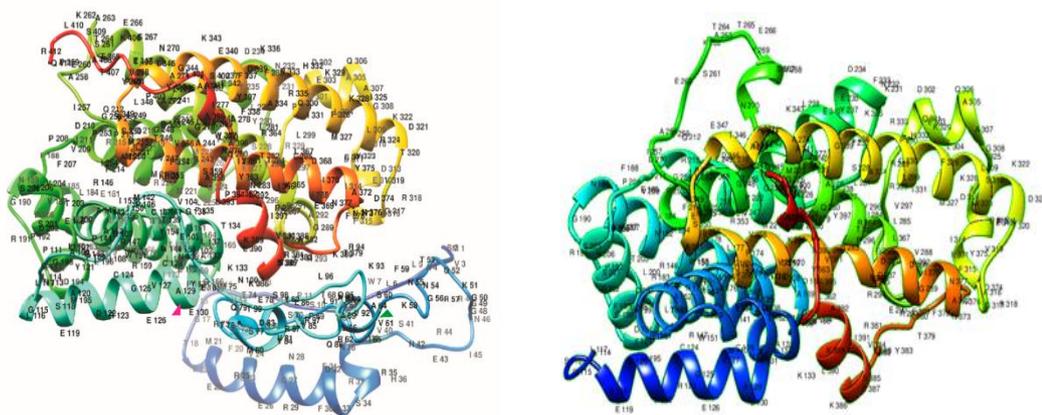


Рисунок 3.2.5 – Пространственная структура PSY1 *S. lycopersicum* сорта Heinz и *S. pennellii*, построенная в Phyre2. Цепи цветные от N- к С-концу. Два остатка фланкирующие TP (V61 и A129) обозначены зеленым и розовым треугольниками.

Было показано, что подобно структурам родственных ферментов, гомологи PSY1 томата характеризовались наличием большого числа антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, образующих большую центральную полость, являющуюся каталитическим центром. В целом с использованием программы Phyre2 удалось смоделировать фрагменты длиной 288–300 аминокислот, составляющие 69–71% белка PSY1 (включая участок 109–408 а.о. NH-IPPS домена) с достоверностью более 90%. При сравнении гомологичных белков PSY1 у красноплодных и зеленоплодных видов в доменах TP и NH-IPPS не наблюдалось значительных структурных особенностей.

Таким образом, все идентифицированные гомологи PSY1 видов томата были высоко консервативными и имели одинаковые функционально важные остатки, что указывает на то, что ферменты должны иметь одинаковый каталитический механизм, основанный на образовании С-концевого каталитического центра — большой центральной полости, состоящей из двух антипараллельных альфа-спиралей и мотивов DELVD и DVGED на противоположных сторонах (рис. 3.2.5). Данные проведенного структурного анализа белков PSY1 указывают на то, что собственно каталитическая функция гомологичных белков PSY1 в каротиногенезе сохраняется как у дикорастущих, так и у культивируемого видов.

Известно, что N-концевой транзитный пептид (TP) отвечает за перенос PSY1 в пластиды (Giorgio et al., 2008; Cao et al., 2019), и его полиморфизм может быть одним из основных видоспецифических признаков у растений (Da Silva Mendes et al., 2015). Действительно, у анализируемых видов томатов было обнаружено, что N-концевой TP является наиболее полиморфным участком PSY1, который отличает виды секции *Lycopersicon* от других представителей *Solanaceae* (рис. 3.2.4, 3.2.5). Кроме того, оказывается, что в ходе эволюции TP фитоенсинтазы виды родов *Capsicum* и *Solanum* утратили мотив FSCLGGSRTKNGRIFSVRSAIVATPAGEM (мотив 15), характерный для представителей других родов *Solanaceae* и вместо этого приобрели мотив CNERIKRG (мотив 14), который позже был утерян у видов секции *Petota* и *Lycopersicon* (рис. 3.2.4).

При сравнении белковых последовательностей паралога PSY и паралога каротин-бета-гидроксилаз (CrtR-b1, CAB55625; CrtR-b2, ABI23730) было обнаружено некоторое сходство (82,6% сходства последовательностей), что может указывать на раннюю дупликацию предка гена *CrtR-b*, что привело к образованию паралогов PSY (PSY1, PSY2 PSY3) и их диверсификацией и с тканеспецифичной транскрипцией кодирующих их генов (Giorgio et al., 2008).

Таким образом, все идентифицированные гомологи PSY1 видов томата были высоко консервативными и имели одинаковые функционально важные остатки, что указывает на то, что ферменты должны иметь одинаковый каталитический механизм, основанный на образовании С-концевого каталитического центра — большой центральной полости, состоящей из двух антипараллельных альфа-спиралей и мотивов DELVD и DVGED на противоположных сторонах (рис. 3.2.5) (Shumskaya et al., 2012). Данные структурного анализа белков PSY1 указывают на то, что собственно каталитическая функция гомологичных белков PSY1 в каротиногенезе сохраняется как у диких, так и доместичированных видов томата.

### 3.2.3. Филогения видов томатов на основе PSY1

Кодирующие последовательности идентифицированных и уже известных генов *PSY1* использовали для анализа филогении томатов секции *Lycopersicon*, видов других секций рода, представителей других родов семейства *Solanaceae* и последовательности генов двух других изоформ фитоенсинтазы PSY2 и PSY3.

Все анализируемые последовательности PSY1 формировали одну кладу, сестринской к которой была клада PSY2, что говорит об эволюционной близости этих генов/белков. Последовательности PSY1 видов томата были разделены на две основные подклады: красно- и желтоплодных видов и зеленоплодных видов (рис. 3.2.6).

Дикорастущие зеленоплодные *S. habrochaites* и *S. pennellii* были сгруппированы вместе с желтоплодным *S. cheesmaniae*, который является еще одним дикорастущим видом томата и располагается между эволюционно наиболее молодыми красноплодными видами и наиболее древними зеленоплодными видами.

На основании ранее проведенного филогенетического анализа генов фитоенсинтазы *S. lycopersicum* было предположено, что изначально возник ген *PSY3*. Во время более древнего и специфического события полногеномной дупликации у двудольных растений, *PSY3* дублировался с образованием *PSY2*. И последующая дупликация уже *PSY2* привела к образованию *PSY1* (Tanksley, McCouch, 1997; Galpaz et al., 2006; Gao et al., 2016).

Проведенный нами филогенетический анализ на основе данных полногеномных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей PSY1 красноплодных и зеленоплодных видов томата дают схожие результаты. Результаты показали, что анализируемые виды томатов были сгруппированы в соответствии с общей принятой эволюцией *Solanaceae*, и на основе последовательности PSY1 могут быть разделены на две основные клады (группы): красноплодные и зеленоплодные (рис. 3.2.6), указывающие на

то, что PSY1 может быть филогенетическим маркером для изучения эволюции томатов. В кладе зеленоплодных видов наиболее отдаленные, *S. habrochaites* и *S. pennellii*, были сгруппированы вместе в соответствии с неполностью разрешенной дихотомией двух видов, принадлежащих к разным неформальным группам *Etiopersicon* и *Neolycopersicon* соответственно (Peralta et al., 2001). Иногда *S. pennellii* считается промежуточным видом между *S. habrochaites* и *S. arcanum* (Mueller et al., 2005). Две другие неформальные группы *Lycopersicon* включали желто- и красноплодные виды томатов (Peralta et al., 2001).

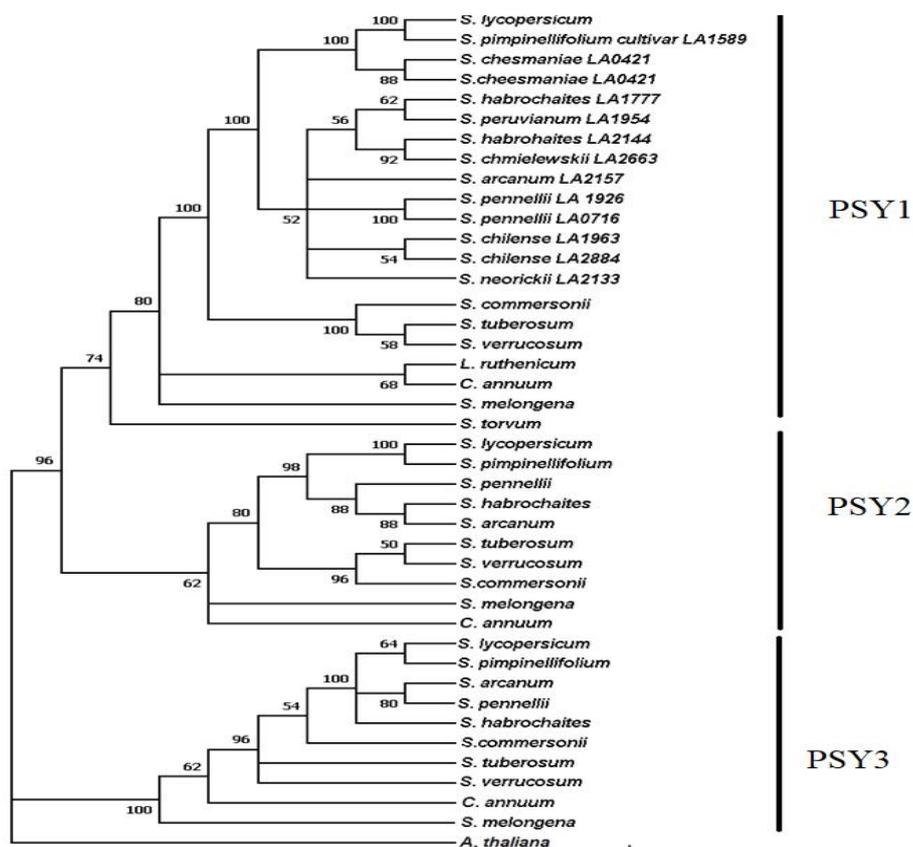


Рисунок 3.2.6 – Филогения видов Solanaceae (желто- и красноплодные (*S. cheesmaniae* LA0421, *S. pimpinellifolium* 1018VIR, *S. lycopersicum*)), зеленоплодные (*S. chilense* (LA1963, LA2884), *S. habrochaites* (LA12144, LA1777), *S. pennellii* (LA0716, LA1926), *S. peruvianum* (LA1954), *S. chmielewskii* (LA2663), *S. neorickii* (LA2133), *S. arcanum* (LA2157), *S. tuberosum*, *S. commersonii*, *S. verrucosum*, *S. melongena*, *C. annuum*, *L. barbarum*) на основе кодирующих последовательностей генов PSY1. В качестве out группы использовали ген PSY *A. thaliana* (Brassicaceae). Метод NJ; 1000 бутстреп-реплик.

Накопление каротиноидов является главной особенностью *S. lycopersicum* и *S. pimpinellifolium*, относящихся к кладе *Lycopersicon*, красный цвет плодов, которых обусловлен накоплением ликопина (Bai, Lindhout, 2007). У *S. cheesmaniae* и *S. galapagense* ликопин далее перерабатывается в каротин, придающий желтую и оранжевую окраску плодам (Ronen et al., 2000; Paran, Кнаар, 2007). Учитывая консервативную структуру PSY1

как ключевого каротиногенного фермента во всех видах, возникает вопрос, почему плоды *S. lycopersicum* краснеют, а плоды диких томатов остаются зелеными или слегка желтыми. Ответ может заключаться в дифференцированной регуляции экспрессии *PSY1*, уровень которых положительно коррелирует с накоплением каротиноидов.

### 3.2.4. Экспрессия *PSY1* в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции *Lycopersicon*

Экспрессию *PSY1* оценивали в молодых листьях, цветках в процессе развития (бутонах и лепестках венчика полностью открытого цветка), а также в плодах в процессе созревания (на стадиях IG1, MG, BR и RR/FR) у образцов семи дикорастущих видов, различающихся по окраске плодов — зеленоплодные *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716, *S. chmielewskii* LA2665, *S. arcanum* LA2157 и *S. neorickii* LA2133, желтоплодный *S. cheesmaniae* LA0421 и красноплодный *S. pimpinellifolium* VIR 1018 и трех сортах с различной окраской плода – красноплодных Heinz и Корнеевский и желтоплодного Копилка желтая.

Экспрессия в листьях всех проанализированных сортов и видов томатов *PSY1* была минимальной или отсутствовала (рис. 3.2.7а), что совпало с ранее полученными данными по анализу транскрипции *PSY1* в листьях томата сорта Heinz и образца *S. pennellii* (Araújo et al., 2007; Bolger et al., 2014).

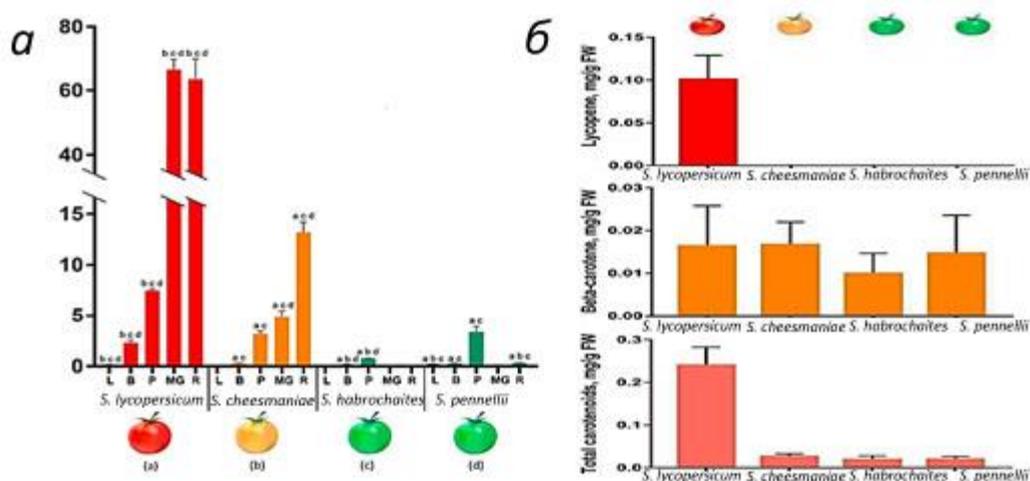


Рисунок 3.2.7 – (а) Экспрессия мРНК *PSY1* в листьях (L), молодых цветочных бутонах (B), желтых лепестках (P), в плоде на стадии MG (MG) и спелом плоде (R) *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706, *S. cheesmaniae* LA 0421, *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716. Строчные буквы над диаграммой - статистически значимые различия (р-значение <0,005) между уровнями экспрессии генов в одной и той же ткани или стадии разных видов: *S. lycopersicum*, *S. cheesmaniae*, *S. habrochaites* и *S. pennellii*. (б) Содержание ликопина, β-каротина и общих каротиноидов в плодах *S. lycopersicum* cv. Heinz, *S. cheesmaniae* LA0421, *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716 (Efremov et al., 2020).

Лепестки венчика у всех видов томата желтые и по мере развития цветка их окраска из бледно-желтой становится ярко-желтой. Анализ экспрессии в бутонах и лепестках полностью открытых цветков был проведен у красноплодного сорта Корнеевский, в желтоплодного вида *S. cheesmaniae* и двух диких зеленоплодных видов *S. habrochaites* и *S. pennellii*. Самый высокий уровень мРНК *PSY1* в лепестках наблюдался у *S. lycopersicum*, где он превышал в 2 раза таковой у *S. cheesmaniae* и у *S. pennellii* и в 10 раз у *S. habrochaites*. У *S. pennellii* уровень экспрессии *PSY1* был максимальным в желтых лепестках и достаточно низкий в бутонах (рис.3.2.7). У другого зеленоплодного вида, *S. habrochaites*, экспрессия *PSY1* была на очень низком уровне не только в бутонах, но и лепестках (рис.3.2.7), хотя они и имели желтую окраску, аналогичную цветкам остальных видов. Таким образом, полученные данные подтверждают предположение о том, что ген *PSY1* первоначально участвовал в окраске цветков томата, которые и у красноплодных, и у зеленоплодных видов одинаково желтые, и только позже у эволюционно более молодых красноплодных видов приобрел дополнительную функцию в пигментации плодов (Galpaz et al., 2006).

Наибольший интерес представлял анализ экспрессии гена *PSY1* в плодах по мере их созревания у красноплодных видов (трех сортов *S. lycopersicon* с красной и желтой окраской плода, красноплодного *S. pimpinellifolium*, желтоплодного *S. cheesmaniae* и зеленоплодных видов (*S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum* и *S. neorickii*) (рис. 3.2.8). У красноплодных, эволюционно более молодых видов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* (как у красноплодных, так и желтоплодных сортов), ген *PSY1* экспрессировался в плодах в процессе созревания, постоянно увеличивалась с очень низкого уровня на стадии IG до высоких на стадиях BR и RR. Аналогичная динамика наблюдалась у желтоплодного *S. cheesmaniae*, у которого экспрессия гена *PSY1* повышалась в процессе развития плода, но уровень экспрессии был примерно в 5-7 раз ниже у красноплодных *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* (рис.3.2.8). У зеленоплодного *S. pennellii* транскрипция *PSY1* также была обнаружена во всех протестированных тканях; однако, в отличие от желтоплодного *S. cheesmaniae* и красноплодных видов, уровень экспрессии *PSY1* был низким в плодах как на стадии MG, так и на стадии полной спелости FR, где был примерно в 5–13 раз ниже, чем у желтоплодного *S. cheesmaniae*, и в 65 раз ниже, чем у красноплодного *S. lycopersicum*. У других зеленоплодных видов, *S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum* и *S. neorickii*, уровень экспрессии *PSY1* также был минимальным в плодах на стадии MG и FR, и сопоставим с уровнем экспрессии *PSY1* *S.*

*pennellii*. При этом следует отметить, что у зеленоплодных видов уровни *PSY1* в зеленых (фотосинтезирующих) плодах были сопоставимы с экспрессией в листьях.

Экспрессия *PSY1* образца *S. habrochaites* LA2144 сходна с таковой в других проанализированных зеленоплодных видах тем, что практически отсутствовала в спелых плодах, и проведенный биохимический анализ выявлял минимальное количество каротиноидов в зрелом плоде (рис. 3.2.8). При этом паттерн экспрессии LA2144 был несколько иной, чем у ранее проанализированного образца *S. habrochaites* LA1777 (Kilambi et al., 2013), для которого был показан более высокий уровень транскрипции *PSY1* в зрелом плоде, хотя при этом не повышалось содержание фитоена и фитофлуена (Kilambi et al., 2013). Биохимический анализ выявил достаточно высокое содержание  $\beta$ -каротина (рис. 3.2.7б) в зрелом плоде зеленоплодных видов *S. pennellii*. и *S. habrochaites* LA2144, также как это было показано ранее для *S. habrochaites* LA1777 (Kilambi et al., 2013). Высокое содержание  $\beta$ -каротина, сопоставимое с таковым у красноплодного *S. lycopersicum* (рис. 3.2.7б), может быть результатом биосинтеза  $\beta$ -каротина в оставшихся хлоропластах тканей зеленых плодов за счет экспрессии как *PSY1*, так и *PSY2* (Giorio et al., 2008).

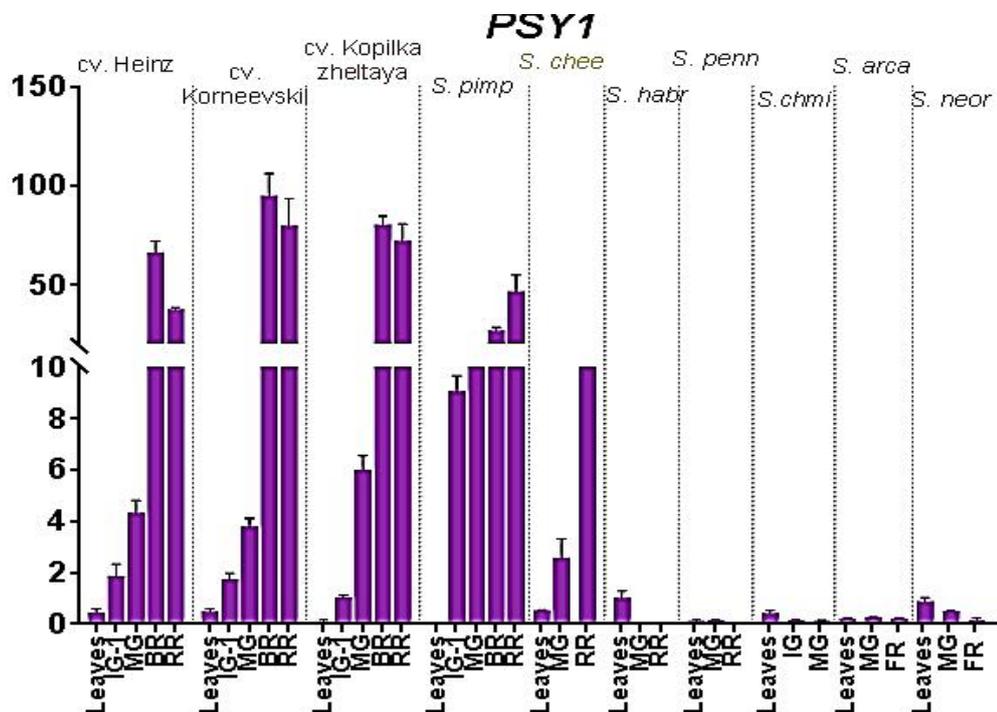


Рисунок 3.2.8 – Экспрессия *PSY1* в листьях (Leaves), в плоде на стадии IG-1, MG, BR, RR в *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706, Корнеевский и Копилка желтая, *S. cheesmaniae* (*S.chee*) LA0421, *S. habrochaites* (*S.habr*) LA2144 и *S. pennellii* (*S.penn*) LA0716, *S. chmielewskii* (*S. chmi*) LA2663, *S. arcanum* (*S. arca*) LA2157 и *S. neorickii* (*S. neor*) в листьях (Leaves) и плодах на стадии MG и FR (Efremov et al., 2020).

Полученные нами данные подтверждают ранее выявленные результаты, что у красноплодного *S. lycopersicum* экспрессия *PSY1* низкая в фотосинтезирующих тканях и высокая в лепестках и спелых плодах (Giorio et al., 2008), тогда как у зеленоплодных видов (*S. peruvianum*, *S. pennellii*) *PSY1* практически не экспрессируется в спелых плодах, которые не накапливали ликопин и содержали в 100 раз меньше  $\beta$ -каротина, чем красноплодные томаты (Meléndez-Martínez et al., 2010; Bolger et al., 2014).

Однако, отвечая на вопрос, почему спелые плоды диких томатов остаются зелеными, нельзя просто связать только с дифференциальной экспрессией *PSY1*. Например, сверхэкспрессия *PSY* в листьях *A. thaliana* не приводит к изменению их окраски с зеленой на оранжевую или красную и содержание каротиноидов в них остается неизменным (Lätari et al., 2015). Зеленый цвет спелых плодов у диких видов, помимо низкой транскрипции *PSY1*, может быть связан с отсутствием специальных глобулярных структур для накопления каротиноидов, которые обычно присутствует в хромопластах нефотосинтезирующих тканей или формируются в хромопластах (Fraser, 2007; Kilambi et al., 2013; Osorio, 2019; D'Andrea, Rodriguez-Concepcion, 2019). В связи с этим интересно что, как показано, экспрессия *PSY1* и ферментативная активность PSY1 может быть весьма значительна в плодах образца зеленоплодного *S. habrochaites*; но это не приводит к накоплению каротиноидов из-за нарушения процессов образования хромопластов (Kilambi et al., 2017) из-за мутации в регуляторном белке ORANGE (Osorio, 2019; D'Andrea, Rodriguez-Concepcion, 2019). В соответствии с этим нами был обнаружен высокий уровень транскрипции *PSY1* в лепестках цветка и красных и желтых плодах, но не в листьях (рис. 3.2.7 и 3.2.8), что подтверждает специфичность экспрессии *PSY1* у видов томата (Giorio et al., 2008). Отсутствие пигментов желтого и красного цвета в спелых зеленых плодах может быть также результатом ингибирования PSY1.

Таким образом, содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется уровнем экспрессии *PSY1*, определяя количество бесцветных предшественников окрашенных каротиноидов. В целом содержание окрашенных каротиноидов в спелых плодах напрямую коррелировало с уровнем экспрессии *PSY1* — самый высокий у *S. lycopersicum*, умеренный у *S. cheesmaniae* и самый низкий у *S. habrochaites* и *S. pennellii* (рис. 3.2.7; табл. 3.2.2).

Уровень экспрессии *PSY1* у красноплодных томатов был намного выше, чем у красноплодного перца *C. annuum* на стадии RF (Romer et al., 1993). Считалось, что это связано с мутацией Y136N (Cao et al., 2019), которая была обнаружена во всех гомологичных генах *PSY1*, идентифицированных в образцах. Две другие известные

замены в PSY1, которые могут, влиять на уровень биосинтеза каротиноидов, это замена на C-конца P на L в PSY-E1 и A191D. Первая, обнаруженная в результате отбора белого эндосперма, способна снижать биосинтез каротиноидов в зерне кукурузы (Zhang, Dubcovsky, 2008). Вторая приводит к повышению ферментативной активности PSY (Welsch et al., 201057).

Таблица 3.2.2. Содержание каротиноидов в спелых плодах

Вид	Содержание пигментов в спелых плодах, мкг/г сырого веса				
	Хлорофилл а и b	Ликопин	Общие каротиноиды	$\beta$ -каротин	Другие каротиноиды
<i>S. lycopersicum</i>	-	0.09	0.24	0.01	-
<i>S. cheesmaniae</i>	-	-	0.03	0.02	-
<i>S. chilense</i>	0.03	-	0.01	0.01	-
<i>S. habrohaites</i>	0.06	-	0.02	0.01	-
<i>S. pennellii</i>	0.09	-	0.02	0.02	-

Таким образом, было показано, что плоды зеленоплодных видов *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716, *S. chmielewskii* LA2665, *S. arcanum* LA2157 и *S. neorickii* LA2133 имеют нормальный белок, но низкая экспрессия гена *PSY1* связана с его регуляцией (Bolger et al., 2014; Kilambi et al., 2017).

### 3.2.5. Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) гена *PSY1* у красноплодного и зеленоплодных видов томата

Получены и проанализированы промоторные (~0.9 Т.П.Н.) и 5'-UTR (~1.5 т.п.н.) последовательности генов- гомологов *PSY1* у видов томатов, красноплодного *S. lycopersicum* сорт Heinz и зеленоплодных видов *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA2144), *S. arcanum* (LA2157). Размеры промотора и 5'-UTR составляли 906/1535 п.н. у *S. lycopersicum*, 919/1550 п.н. у *S. pennellii* и 911/1537 п.н. у *S. arcanum*. В сравнении с последовательностью промотора и 5'-UTR *PSY1 S. lycopersicum*, промотор и 5'-UTR *PSY1 S. pennellii* и *S. arcanum* содержали 56 и 63, 60 и 70 SNPs, соответственно, что указывает на 6% и 3,98% вариабельности соответственно, что, как и ожидалось выше, чем в кодирующих последовательностях. Поиск сайтов, значимых для регуляции транскрипции *PSY1*, показал, что последовательность 2,5 т.п.н., содержащей промотор и 5' UTR -гена *PSY1* включали 37 типов регуляторных элементов, связанных с тканеспецифической экспрессией и реакцией на фитогормоны и факторы стресса. Среди них 32 были общими для *PSY1* обоих видов, и 11 видоспецифичными; среди последних имелись свето- и этилен-чувствительные элементы, сайты, связанные с реакциями на салициловую кислоту,

холод и сайты связывания MYB факторов транскрипции, участвующие в ответных реакциях на засуху (рис.3.2.9, табл. 3.2.3.) (Бабак и др., 2019; Бабак и др., 2020).

По сравнению с зеленоплодным образцом *S. pennellii*, в регуляторной области *S. lycopersicum* были утеряны светочувствительные элементы -chs - Unit 1 m1 и мотив TCT, а также мотивы TCA, MBS элементы и мотив AAGAA с неизвестной функцией. При этом были приобретены другие светочувствительные элементы (сайт связывания 3-AF3 и мотив GATA), а также этилен-чувствительные элементы (ERE), WUN мотив, и AACСТААССТ мотив с неизвестной функцией (рис. 3.2.9, табл. 3.2.3.). Можно предположить, что видоспецифичные различия в экспрессии *PSY1* могут зависеть от вариаций в последовательностях промотора/5'- UTR, прежде всего вариациями наличия и расположения cis-регуляторных элементов и сайтов связывания факторов транскрипции.

Таблица 3.2.3. Регуляторные элементы в промоторе и 5'-UTR гена *PSY1* красноплодного *S. lycopersicum* и зеленоплодного *S. pennellii*.

	Название элемента	Последовательность	<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz		<i>S. pennellii</i> LA0716		Описание
			Цепь	Расположение	Цепь	Расположение	
1	chs-Unit 1 m1		n/d		-	-1110	Светочувствительные элементы
2	Box II	ACACGTAGA	-	-1713	-	-1735	
3	GATA-motif	AAGGATAAGG	+	-2207	n/d		
4	GTGGC-motif	GATTCTGTGGC	+	-564	+	-566	
5	TCT-motif		n/d		+	-2419	
6	AE-box	AGAAACAA	+	-528	+	-530	светочувствительные элементы
7	Box 4	ATTAAT	+	-2373	+	-2402	
			+	-1685	+	-1707	
8	GA-motif	ATAGATAA	n/d		-	-2143	Светочувствительные элементы
9	I-box	TAGATAACC	n/d		+	-28	
10	3-AF3 binding site	САСТАТСТААС	+	-2321	n/d		
11	GT1-motif	GGTТАА	+	-1101	+	-1102	Сайты связывания факторов AREB/ABF
			n/d		+	-1079	
12	ABRE	TACGTGTC	+	-1711	+	-1733	
		ACGTG	+	-675	+	-677	
13	ABRE3a	TACGTG	+	-1710	+	-1732	
			+	-1711	+	-1733	
14	ABRE4	TACGTG	+	-676	+	-678	
		CACGTA	-	-1711	-	-1733	
15	AT~ABRE	TACGTGTC	-	-676	-	-678	
			+	-1711	+	-1733	
16	ERE	ATTTТААА	+	-1272	n/d		Этилен-чувствительные элементы

17	TGA-element	AACGAC	+	-2241	+	-2270	Ауксин чувствительные элементы
			+	-2219	+	-2248	
18	CGTCA-motif	CGTCA	-	-1846	-	-1876	Метилжасмо нат чувствительные элементы
19	STRE	AGGGG	+	<b>-1384</b>	<b>n/d</b>		Стресс-чувствительные элементы
			-	<b>-1459</b>			
			+	-712	+	-714	
20	TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	+	-16	+	-16	
21	ARE	AAACCA	-	<b>-1988</b>	<b>n/d</b>		Необходимы для анаэробной индукции
			+	<b>-1964</b>			
			-	-265	-	-265	
			+	-1527	+	-1560	
			-	-204	-	-204	
			-	-682	-	-684	
22	WUN-motif	AAATTACT	-	-102	-	-102	Стресс-чувствительный элемент
23	CAT-box	GCCACT	-	-1496	-	-1495	Связаны со специфичной для меристем экспрессией
			-	<b>-1221</b>	<b>n/d</b>		
			<b>n/d</b>		-	<b>-1528</b>	
24	AT~TATA-box	TATATA	+	<b>-1391</b>	<b>n/d</b>		
			-	<b>-973</b>			
			-	-1007	-	-1007	
			-	-1159	-	-1164	
25	CAAT-box	CAAT/CAAAT	43 repeats		42 repeats		Основной промоторный элемент
26	TATA-box	TATAAAAT; TATAAATA; TATAAAA; TATA	multiple repeats		multiple repeats		Основной промоторный элемент
27	W box	TTGACC	-	-1894	-	-1924	Сайты связывания WRKY TF
28	MBS	CAACTG	<b>n/d</b>		-	<b>-1825</b>	Сайты связывания MYB TF
29	MRE	AACCTAA	-	-2275	-	-2286	Сайты связывания MYB TF
			<b>n/d</b>		-	<b>-580</b>	
30	MYB	TAACTG	+	-551	+	-553	Сайты связывания MYB TF
			<b>n/d</b>		-	<b>-1825</b>	
			+	<b>-289</b>	<b>n/d</b>		
		CAACAG	-	-517	-	-519	
			<b>n/d</b>		-	<b>-1538</b>	
CAACCA	+	<b>-24</b>	<b>n/d</b>				

		TAACCA	-	-309	-	-311	
			n/d		+	-24	
31	MYC	CATGTG	-	-787	-	-788	
			-	-278	-	-278	
32	AS-1 (activation sequence-1)	TGACG	+	-1846	+	-1876	Вирусные и бактериальные промоторы
33	AT1-motif	AATTATTTTTTA TT	-	-2111	n/d		Сайт связывания ATBP-1
34	G-box	TACGTG	+	-1711	+	-1733	Многофункц иональные
			+	-676	+	-678	
35	Unnamed_2	AACCTAACCT	-	-1107	n/d		
36	Unnamed_4	CTCC	13 repeats		13 repeats		
37	AAGAA-motif	GAAAGAA	n/d		+	-1515	

Таким образом, анализ 37 типов регуляторных элементов в последовательности промотора и 5' UTR гена *PSY1*, указывает на то, что транскрипция *PSY1* может регулироваться в ответ на свет, абиотические стрессы и гормоны, такие как метилжасмонат (MeJA), ауксины, абсцизовую кислоту (АБК) и этилен. В промоторе и 5'-UTR гена *PSY1* были выявлены вариации в наличии регулирующих элементов между красноплодным *S. lycopersicum* и зеленоплодным *S. pennellii*, например, потеря одних и приобретение других светочувствительных элементов. Так как каротиноиды и их производные активно вовлечены в ответ на стрессы, отсутствие *myb* элементов у *S. lycopersicum* в сравнении с *S. pennellii* может свидетельствовать о меньшей устойчивости сортов томатов к абиотическим стрессам по сравнению с их дикими родичами, что подтверждается данными о высокой устойчивости к абиотическим стрессам *S. pennellii* (Bolger et al., 2014). АБК представляет собой апокаротиноид, участвующий в процессах развития растений, включая созревание семян и стрессоустойчивости (Dong et al., 2015), тогда как метилжасмонат (MeJA) и ауксины вместе способствуют устойчивости к патогенам (Bürger, Chory 2019). Наличие большого количества гормон-чувствительных элементов в промоторе/5'-UTR гена *PSY1* у красноплодного и зеленоплодного видов (рис. 3.2.9, табл. 3), указывают на участие *PSY1* в регуляции гормонально-опосредованной передачи сигналов в томатах.

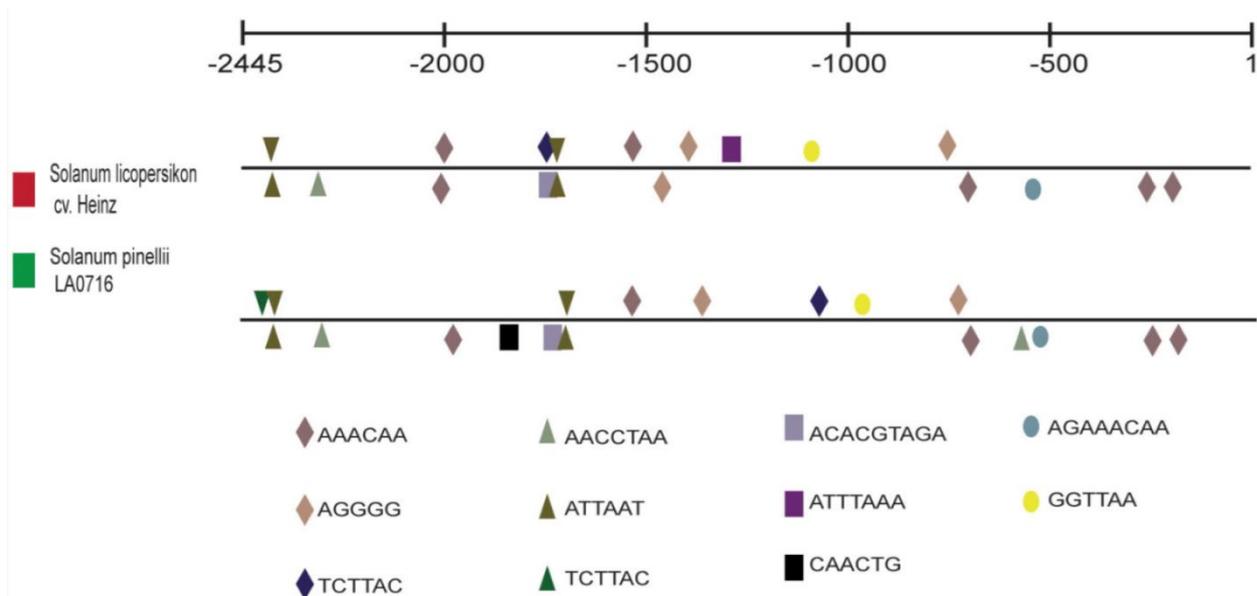


Рисунок 3.2.9 – Расположение регуляторных элементов, идентифицированных *in silico* в промоторных последовательностях *S. lycopersicum* сорта Heinz 1706 и *S. pennellii* LA0716 *PSY1*. Красные и зеленые квадраты соответствуют окраска плодов анализируемых образцов томатов.

Ранее сообщалось, что элементы, чувствительные к гиббереллину (GAs), обнаруживались только в 5'-UTR гена *PSY2* *S. lycopersicum* (Dong et al., 2015), но не в последовательности *PSY1*, несмотря на то что GAs участвуют в созревании плодов и имеют тот же предшественник (GGPP), что и каротиноиды (Bürger, Chory 2019). Мы также не нашли гиббереллин-чувствительные элементы P-box и GARE ни в промоторе, ни в 5' UTR, ни у красноплодного, ни у зеленоплодного видов. Однако обнаружили их в интроне I *PSY1* и последовательности экзонов - P-box (CCTTTTG) в интронах IV и V всех анализируемых зеленоплодных видов и GARE (TCTGTTG) в интроне II всех красноплодных видов и в интроне III *S. habrochaites* LA2144.

Хотя ранее было показано, образование этилена непосредственно не влияет на каротиногенез (Fraser et al., 1994), тем не менее, в промоторе и 5'-UTR гена *PSY1* *S. lycopersicum* были обнаружены *cis*-элементы, чувствительные к этилену (рис. 3.2.9., табл. 3), что может объяснить более сильную индукцию каротиногенеза и, следовательно, более раннее созревание плодов по сравнению с зеленоплодными видами. Этилен координирует уровни экспрессии генов в плодах, и мутация в рецепторе этилена влияет на экспрессию более 300 генов (Alba et al., 2015). При анализе *cis*-активных элементов в промоторе (2000 п.н.) *PSY1* у *N. tabacum* было показано, что большинство из них, так же, как и в нашем случае, это светочувствительные элементы (Wang et al., 2021). Многие из этих элементов, выявленных в промоторной области *PSY1* *N. tabacum*, были детектированы и в промоторе анализируемых видов томата (рис. 3.2.9., табл. 3), за исключением, *chs*-CMA1a, TCT- и

GA-мотива что, возможно, связано с разницей последовательностей у представителей разных родов *Solanaceae*. Набор других выявленных *cis*-активных элементов, участвующих в ответе на температурный стресс (LTR), засуху (MYB, TC-богатые) или фитогормоны были схожи у табака и видов томата (табл. 3.1.3.) (Wang et al., 2021).

Таким образом, наличие разнообразных *cis*-активных элементов в промоторе и 5' UTR *PSY1*, как и у красноплодного *S. lycopersicum* и зеленоплодных видов *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. arcanum*, а также присутствие этих же элементов в регуляторных последовательностях генов *PSY* и у других видов указывает на то, что их экспрессия 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.

Таким образом, в результате проведенной работы были впервые определены (клонированы и секвенированы) полнокопийные последовательности 21 новых гомологов *PSY1* у 12 сортов и девяти диких видов дикорастущих и культивируемых видов томатов секции *Lycopersicon* рода *Solanum*. Длина гомологов гена *PSY1* *S. lycopersicum* и дикорастущих видов варьировала от 4840 до 4949 п.н. за счет варибельности некодирующей области гена (5'-UTR), до первого кодирующего экзона. Анализируемые последовательности *PSY1* сортов и видов томата были достаточно консервативны, общий уровень полиморфизма составил 10 %. В составе кодирующих последовательностей выявлено 127 SNPs, 69 из которых приводили к аминокислотным заменам, 35 из которых были радикальными. Общая аминокислотная варибельность составила 16,7%. В составе белков были определены 13 консервативных мотивов, которые характерны для всех анализируемых образцов. Были найдены некоторые мотивы, которые присутствовали только у определённых групп (14 мотив у *S. melongena* и представителей *Solanae*; 15 мотив у *Lycium*). Проведенный анализ промоторов и 5'-UTR выявил 37 *cis*-активных сайта, 30 из которых были общими.

### 3.2.6. Сравнительный анализ структурно-функциональной характеристики и экспрессии гена *PSY1* у видов перца рода *Capsicum* с различной окраской зрелого плода

Помимо видов томата секции *Lycopersicon* рода *Solanum* другой род *Solanaceae* - род *Capsicum*, объединяет виды перца, сочные спелые плоды которых характеризуются высоким содержанием каротиноидов. Было показано, что некоторые виды перца (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*) на этапе полной спелости плода могут

накапливать каротиноиды, но в отличие от томата не ликопин, а капсирубин (70 %) и капсантин (10%). В то же время, другие виды перцев (например, *C. pubescence*, *C. tovarii*, и др.) не накапливали каротиноидов. То есть наблюдалась ситуация схожая с таковой у рода *Solanum* в целом и секции *Lycopersicon* в частности.

Каротиноидный путь в плодах *Capsicum* идет дальше синтеза ликопина и каротинов, обычных для плодов томата, и доходит до ксантофиллов  $\beta$ -каротинового пути, из которых под действием специфичного для видов *Capsicum* фермента капсантинкапсорубинсинтазы (CCS) и образуются красные пигменты капсантин и капсорубин (Barboza et al., 2019). При этом суммарное содержание каротиноидов в плодах перца может значительно превышать таковое у томата (Fraser et al., 1994; Barboza et al., 2019). В связи с этим представлялось интересным провести анализ паралогов фитоенсинтазы у видов *Capsicum*, сравнить уровни варибельности и экспрессии в плоде в процессе созревания у образцов видов перца, различающихся содержанием каротиноидов и, как следствие, окраской плода.

Для характеристики генов фитоенсинтазы *PSY1* были взяты образцы шести видов *Capsicum* – культивируемых *C. baccatum* (сорт Визирь), *C. chinense* (сорт Жгучий король и Pimenta Da Neyde) и *C. frutescens* (сорт Tabasco и Самоцвет), и дикорастущих *C. tovarii*, *C. eximium* и *C. chacoense* (табл.3.2.4). Данные виды охватывают пять из шести выделяемых субклад перцев. Зрелые плоды выбранных образцов имеют красную окраску, за исключением образца *C. chinense* сорт Жгучий король, спелый плод которого темно-желтый. С использованием разработанных праймеров (табл. 3.1.1.) у отобранных образцов шести видов перца были получены и охарактеризованы последовательности генов *PSY1*, гомологичные известным генам *PSY1* томата. Для видов *C. frutescens*, *C. tovarii*, *C. eximium* и *C. chacoense* эти последовательности были идентифицированы впервые и депонированы в генбанк NCBI (MT507262, MT313935, MT313936, MT507261, MT507260, MT507263 и MT507264).

Идентифицированные гены *PSY1* видов перца, как и ожидалось, имели такую же генную структуру, что и у видов томата и включали шесть экзонов. Длина генов *PSY1* перца была короче, чем у томата (3302 п.н. *S. lycopersicum* от ATG до стоп-кодона) и составила 2844 п.н. (*C. annuum*; *C. frutescens*) - 2885 п.н. (*C. Chinense*) (табл.3.2.4). Разница в размере генов *PSY1* перца была обусловлена присутствием вставки 41 п.н. в интроне IV. кДНК *PSY1* у всех исследуемых образцов составила 1260 п.н. (табл. 3.2.4).

Таблица 3.2.4 Характеристика последовательности генов - гомологов *PSY1* у анализируемых сортов и видов томата и перца

<i>Сорт\вид</i>	Цвет спелого плода	№ депонирования в NCBI	Длина гена, п.о	Длина кодирующей части, п.о	Длина белка, а.к.	Изоэлектрическая точка, рI	Молекулярная масса, кДа
<i>C. chinense cv. Pimenta Da Neyde*</i>	Фиолетовый	MT313936	2885	1,260	419	8.14	47.052
<i>C. chinense cv. Жгучий король</i>	Желтый	MT507261	2844	1,260	419	8,27	47,179
<i>C. frutescens cv.Tabasco</i>	Красный	MT507262	2858	1,260	419	8,01	47,165
<i>C. frutescens cv. Самоцвет</i>	Красный	MT313935	2844	1,260	419	8.25	47.126
<i>C. tovarii</i>	Красный	MT507260	2858	1,260	419	8,01	47,165
<i>C. eximium</i>	Красный	MT507263	2857	1,260	419	8,01	47,096
<i>C. annuum cv. Сибиряк</i>	Красный	MT313932	2844	1,260	419	8.25	47.140
<i>C. annuum cv. Сиреный куб</i>	Красный	MT313933	2885	1,260	419	8.14	47.066
<i>C. annuum cv. Отелло</i>	красный	MT313934	2844	1,260	419	8.25	47.094
<i>C. baccatum cv. Визирь</i>	Красный	MT507259	2846	1,260	419	8,25	47.091
<i>C. chacoense</i>	Красный	MT507264	2841	1,260	419	8,01	47.053
<i>C. annuum cv. Несозревающий</i>	Зеленый	MT507246	2844	1,260	419	8,25	47,161
<i>C. annuum cv. Жёлтый букет</i>	Желтый	MT507241	2844	1,260	419	8,37	47,110
<i>C. annuum cv. Кармин</i>	Темно-красный	MT507242	2844	1,260	419	8,25	47,126
<i>C. annuum cv. Сладкий шоколад</i>	Коричневый	MT507244	2844	1,260	419	8,25	47,097

Образцы коллекции ФНЦО\*

Длина белков PSY1 видов перца составила 419 а.о. и была инвариантна (табл. 3.1.1; рис. 3.2.10). В сравнении с PSY1 томата все идентифицированные гомологи PSY1 *Capsicum* имели специфичную вставку R53InsQ64 (RWSFGSCLGGAQ) и делецию на С-конце A408\_R412del (ASLQR). (рис. 3.2.10). Несколько радикальных замещений а.о. было обнаружено при сравнении PSY1 перца с белком PSY1 *S. lycopersicum* (*S. lycopersicum* vs. *Capsicum* spp.): Q79R, P106K, G125S, M195V и W357L (рис.3.2.10).

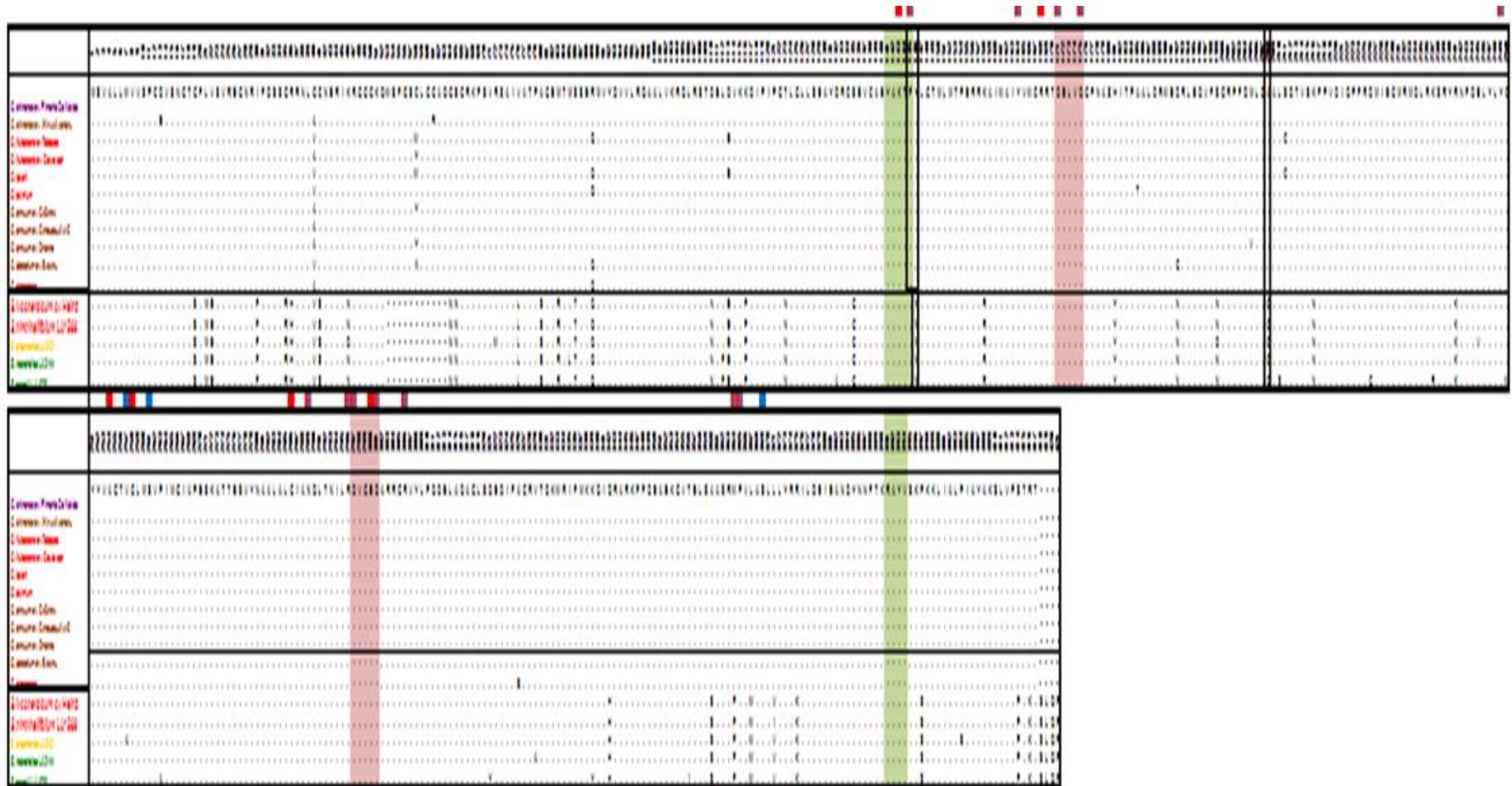


Рисунок 3.2.10 – Сравнительное выравнивание последовательностей идентифицированных гомологов PSY1 образцов видов перца и томата Розовый фон – аспарат-богатые субстрат Mg<sup>2+</sup>-связывающие сайты (DXXXD), светло-зеленый – активный сайт, синие и красные квадраты – каталитические а.о. и субстрат связывающие карманы, рамкой – остатки, важные для активности PSY1

В целом межвидовая вариабельность аминокислотных последовательностей белка PSY1 у анализируемых видов перца ниже, чем в случае видов томата (рис.3.2.10). Проведенный анализ показал, что анализируемые PSY1 видов перца входили в суперсемейство ферментов биосинтеза изопреноидов и содержали консервативный домен head-to-head (HH)-IPPS (81–418 а.о.) с функционально значимыми участками без полиморфизмов. На N-конце белков был предсказан транзитный пептид (рис. 3.2.10.), ответственный за транслокацию ферментов в пластиды (Cao et al., 2019).

Как следует из рисунка 3.2.11., доменные структуры и консервативные мотивы фитоенсинтаз перца и томата имеют высокое сходство и различаются наличием у видов перца специфичного 8 ак. мотива (43-50 а.о.) на границе транзитного пептида и отсутствием характерного для PSY1 томата мотива ASLQR на C-конце белка (рис 3.2.11.). В сравнении с белком *S. lycopersicon* PSY1 *C. annuum* содержал девять замещений а.о., из которых семь, согласно PROVEAN, были радикальными и находились в консервативном домене и два нейтральными и находились в транзитном пептиде. Присутствие радикальных замещений у анализируемых образцов могут влиять на фолдинг зрелых белков фитоенсинтаз, а также на их способность взаимодействовать с белковыми партнерами и осуществлять корректные каталитические функции.

Программа MEME 7.0.26 позволила выявить 12 функциональных доменов и мотивов (рис 3.2.11.)

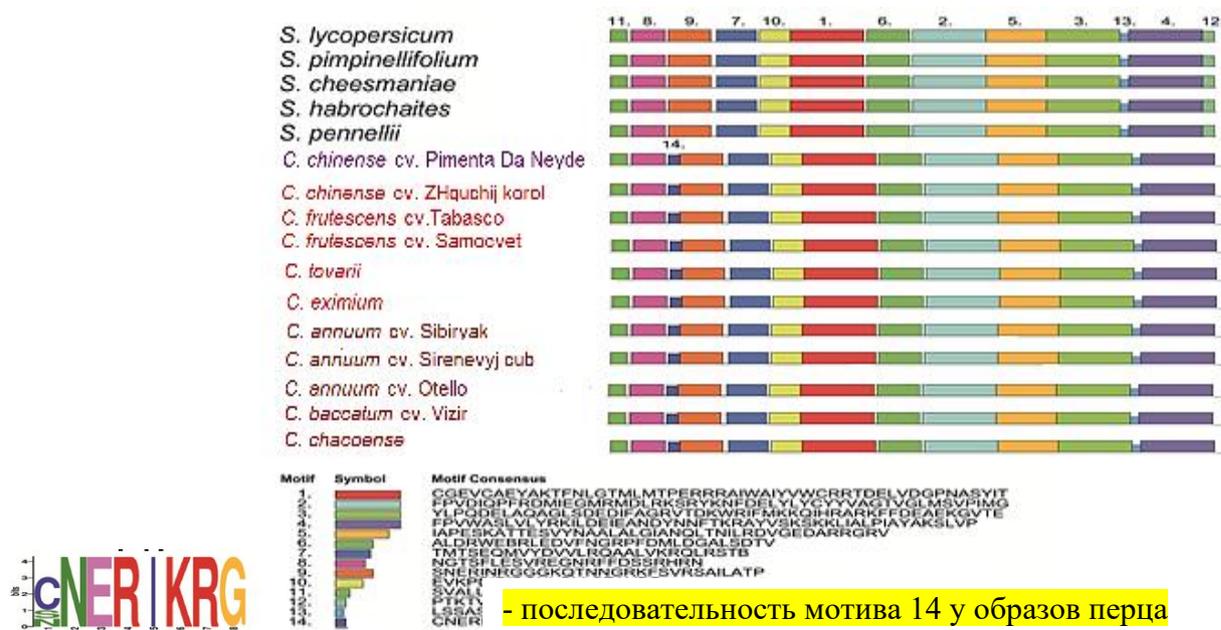


Рисунок 3.2.11 – Распределение консервативных мотивов у гомологов PSY1 видов *Capsicum* (программа MEME 7.0.26).

Ранее, для видов и сортов томата было показано, что существуют две аминокислотных замены, которые определяют различия в уровне активности PSY1, а именно, замены N136Y и G198A в последовательности PSY1 приводили к существенному росту активности и остаток фенилаланина F135 по соседству с тирозином Y136 значительно повышал каротиногенную активность PSY томата (Cao et al., 2019). Интересно, что все исследуемые гомологи PSY1 видов перца имели в позиции, соответствующей N136Y томата, остаток тирозина, соседствующий с фенилаланином (F147Y148), а в позиции, соответствующей G198A томата, – остаток аланина (A210) (рис. 3.2.11.). Это подтверждает то, что мутация Y136N могла возникнуть у PSY1 томата при эволюционном разделении родов *Capsicum* и *Solanum* и до расхождения генома томата и картофеля (Särkinen et al., 2013; Cao et al., 2029).

Аналогично анализу генов PSY1 красноплодных и зеленоплодных видов томата экспрессия генов *PSY1* была охарактеризована в листьях и плодах на трёх стадиях (MG-зрелый зеленый плод, IR-бланжевый плод, RF-спелый плод) созревания у четырёх сортов перца *C. annuum*, различающиеся по окраске спелого плода RF и разным содержанием каротиноидов: Жёлтый букет – желтая окраска спелого плода, низкое содержание каротиноидов; Кармин- красный, высокое; Сладкий шоколад- бордово-красный, высокое; Несозревающий- бледно-зеленый, низкое. Также в анализ были взяты плоды тех же стадий вида *C. baccatum* (сорт Визирь).

В динамике созревания плодов анализируемых образцов перца наблюдался сходный паттерн экспрессии *PSY1* – увеличение уровня транскрипции в процессе созревания плода (резкое увеличение на стадии RF). Максимальный уровень транскрипции наблюдался в спелом плоде сорта Сладкий шоколад, а минимальный – у сорта Несозревающий (рис. 3.2.12).

При этом наблюдалась прямая (но непропорциональная) корреляция между содержанием каротиноидов и уровнем экспрессии в спелом плоде. Так транскрипция *PSY1* в бордово-красном спелом плоде сорта Сладкий шоколад с максимальным содержанием каротиноидов (597.0 мкг/г) в 2.7 раз превышало таковую в бледно-зеленом плоде сорта Несозревающий, имеющем минимальное (55 мкг/г) содержание каротиноидов. Таким образом, у анализируемых образцов шести видов перца (*C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. tovarii*, *C. eximium* и *C. chacoense*) и у четырех сортов *C. annuum* с различной окраской спелого плода были идентифицированы и охарактеризованы последовательности генов фитоенсинтазы *PSY1*, проведено сравнение с гомологичными генами видов томата, которое показало сходство как экзон-интронной структуры генов

фитоенсинтазы у представителей двух родов Solanaceae, так и состава основных функциональных доменов и мотивов белка за исключением отсутствия у представителей *Capsicum* мотива ASLQR на С- конце белка и, наоборот, наличия у PSY1 видов перца мотива CNERIKRG в последовательности транзитного пептида. Выявлен высокий консерватизм функционально значимых областей фитоенсинтаз у анализируемых видов перца. Показан, сходный с томатным, паттерн экспрессии *PSY1* у видов перца в процессе созревания плода с резким увеличением транскрипции на стадии спелого плода. Оценка возможной корреляции с суммарным содержанием каротиноидов показало наличие прямой зависимости между уровнем экспрессии гена *PSY1* и каротиноидной пигментацией плода перца в процессе созревания.

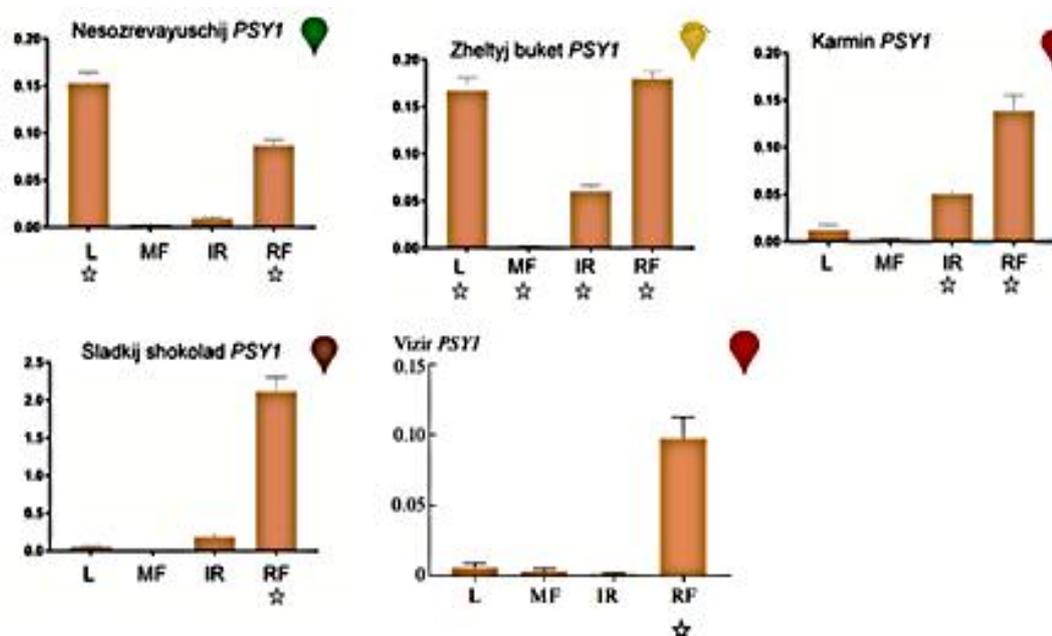


Рисунок 3.2.12 – Экспрессия *PSY1* в листьях (L), в плоде на стадии IG-1, MG, BR, RR у четырёх сортов перца *C. annuum*, различающиеся по окраске спелого плода RF и разным содержанием каротиноидов. Цвет плодов указан справа над рисунком.

### 3.3. Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов 15-цис-зета( $\zeta$ )-каротинизомеразы *Z-ISO* в сортах и дикорастущих видах томата

Ключевым этапом биосинтеза каротиноидов после синтеза фитоена в результате работы фитоенсинтазы PSY является его десатурация и цис-транс-изомеризация. 15-цис-зета( $\zeta$ )-каротинизомераза (*Z-ISO*) катализирует цис-транс-изомеризацию центральной 15–15'-цис-двойной связи с образованием 9,9'-ди-цис- $\zeta$ -каротина из 9,15,9'-три-цис- $\zeta$ -каротин, который в свою очередь был образован путем десатурации фитоена ферментом PDS (Chen et al., 2010) (рис. 1.4). 9,9'-ди-цис- $\zeta$ -каротин является первым, окрашенным каротиноидом пути биосинтеза. Ферментативный катализ белком 15-цис- $\zeta$ -каротинизомеразой *Z-ISO*

особенно необходим в нефотосинтезирующих тканях, так как в фотосинтезирующих тканях эта изомеризация может быть частично опосредована светом (Beltrán et al., 2015; Chen et al., 2010; Zhou et al., 2021).

Показана зависимость активности Z-ISO от окислительно-восстановительного статуса пластид, что указывает на возможное участие этого фермента в эволюционной адаптации растений к изменениям окружающей среды и делает Z-ISO одним из ключевых ферментов в контроле биосинтеза каротиноидов (Li et al., 2007; Beltrán et al., 2015; Davison et al., 2002; Chang et al., 2013). Несмотря на это, к настоящему времени гомологи Z-ISO охарактеризованы только у цианобактерии *Arthrospira platensis*, эукариотической микроводоросли *Euglena gracilis* и только трех видов высших растений — *A. thaliana*, *Z. mays* и *O. sativa* (Chen et al., 2010; Liu et al., 2021; Liu et al., 2020; Zhou et al., 2021; Beltrán et al., 2015; Sugiyama et al., 2020) и роль Z-ISO в накоплении каротиноидов и окраске плодов не была исследована. В связи с этим нам представилось интересным идентифицировать и охарактеризовать последовательности генов-гомологов Z-ISO у видов томата, различающихся окраской плодов.

### 3.3.1. Идентификация, структурный анализ и характеристика варибельности гомологичных генов Z-ISO у образцов видов *Solanum* секции *Lycopersicon*

Для идентификации генов-гомологов Z-ISO и проведения сравнительного молекулярно-генетического анализа были выбраны те же 12 сортов культурного и образцы девяти дикорастущих видов томата секции *Lycopersicon*, что и для анализа *PSYI* (табл.2.1). Так же как и в случае *PSYI*, первым этапом работы стала разработка праймеров для идентификации (амплификации, секвенирования) и экспрессионного анализа гена Z-ISO новых генов-гомологов видов и сортов томата на основе анализа полногеномных последовательностей томата *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (GCA\_000188115.4), *S. pennellii* (GCA\_001406875.2) и картофеля *S. tuberosum* GCA\_000226075.1), представленных в базе данных NCBI. Разработанные праймеры для амплификации всей кодирующей последовательности гена, внутренние праймеры для секвенирования и анализа экспрессии представлены в таблице 2.2.1.

С использованием праймеров Z-ISO<sub>promF</sub> и Z-ISO<sub>endR</sub> были получены амплификаты размером ~6 т.п.н., что совпадало с ожидаемым размером гена. Амплифицированные фрагменты генов-гомологов Z-ISO 21 образцов томата были клонированы в плазмиду pGEM-T и не менее двух клонов каждого гена-гомолога секвенированы. Характеристика полученных последовательностей приведена в табл.3.2.1.

Полученные последовательности новых генов-гомологов *Z-ISO* видов томата депонированы в генбанк NCBI (табл. 3.2.1).

В общей сложности была получена 21 полная последовательность гомологичных генов *Z-ISO*, включая 5'-UTR и промоторные области у девяти дикорастущих видов томата: красноплодного *S. pimpinellifolium* (VIR 1018), желтоплодного *S. cheesmaniae* (LA0421) и дикорастущих 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 окраской плодов.

Полученные последовательности генов-гомологов *Z-ISO* были депонированы в генбанк NCBI (OK31858-OK31877).

Размеры идентифицированных генов-гомологов *Z-ISO* варьировали от 3972 до 4010 п.н. из-за изменчивости и интронов, тогда как кодирующие последовательности (кДНК) были одинакового размера (1110 п.н.) у всех взятых в анализ образцов и включали четыре экзона (табл.3.3.1, рис.3.3.1). Длина участка перед стартовым кодоном, включающая промотор (~1500-1700 т.п.н) и 5'-UTR (~ 500 п.н.) варьировала от 1716 п.н. до 2182 п.н.

По сравнению с последовательностью *Z-ISO S. lycopersicum* сорта Heinz 1706 (NC 015449.3), в полногеномных последовательностях гомологичных генов *Z-ISO* девяти анализируемых видов было суммарно идентифицировано 634 SNP: 118 SNP в экзонах (11%), 310 в интронах (13 %), 120 в 5-UTR(22%) и 430 в промоторах (20 %) (табл. 3.2.1 и табл. 3.2.2.). При оценке уровня полиморфизма зеленоплодных видов между собой и с референсной последовательностью было обнаружено, что промотор, 5-UTR, кодирующая область и аминокислотная последовательность были наиболее полиморфными (табл. 3.3.1 и табл. 3.3.2). При этом наименьшие различия были обнаружены при сравнении *SlZ-ISO* с гомологичным геном красноплодных и желтоплодных видов (*S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae*).

Вариабельность генов *SpZ-ISO* и *ScZ-ISO* составила 3.85 % (163 SNP на 4026 п.н. выровненной последовательности), при этом кодирующая последовательность и белковая характеризовались наименьшим уровнем полиморфизма (1.44 и 2.70% соответственно). Вариабельность промоторных областей у генов этих видов не превышала 3.30 % (78 SNP); более высокий уровень был характерен для 5-UTR области (7.31%; 35 SNP на 480 п.н.).

Таблица 3.3.1 Характеристика последовательности генов - гомологов *Z-ISO* у сортов и видов томата

Вид	Сорт/TGR С номер	Цвет спелого плода	NCBI Gene ID/Solyc No.	Длина гена, п.о	Длина кодирующей части, п.о	Длина 5'- UTR и промотора, п.о	Длина белка, а.о
<b>Z-ISO гены доступные в NCBI GenBank</b>							
<i>S. lycopersicum</i>	cv. Heinz 1706	Красный	NC 015449.3	4,008	1,110	438/1,564	369
<i>S. pimpinellifolium</i> .	LA0480	Красный	NRDK01042673.1: 47213-54353	4,009	1,110	438/1,459	369
<i>S. pennellii</i>	LA0716	Зеленый	CCXL01009615.1	4,006	1,110	468/1,714	369
<i>S. habrochaites</i>	var. <i>LYC4</i>	Зеленый	CBYS010011028.1	4,003	1,110	473/1,307	369
<i>S. arcanum</i>	LA2157	Зеленый	CBYQ010012533.1	4,006	1,110	473/1,648	369
<b>Z-ISO гены идентифицированные в исследовании</b>							
<i>S. lycopersicum</i>	cv. Heinz (FSCV)	Красный	OK318866	4,007	/1,110	438/1,549	369
	cv. Korneevskii	Красный	OK318867	4,006	/1,110	438/1,551	369
	cv. Garmoshka	Красный	OK318869	4,009	/1,110	438/1,562	369
	cv. Malinovyi silach	Красный	OK318868	4,004	/1,110	438/1,561	369
	cv. Zemba	Красно-фиолетовый	OK318871	4,010	/1,110	438/1,560	369
	cv. Paul Robeson	Красно-фиолетовый	OK318870	4,009	/1,110	436/1,559	369
	cv. Black Jack	Красно-фиолетовый	OK318872	4,008	/1,110	436/1,560	369
	cv. Christmas blueberry	Красно-фиолетовый	OK318873	4,009	/1,110	436/1,567	369
	cv. Black cherry	Красно-фиолетовый	OK318874	4,008	/1,110	438/1,552	369
	cv. Cherry zhelto-oranzhevye	Желтый/оранжевый	OK318875	4,008	/1,110	438/1,548	369
	cv. Kopilka zheltaya	Желтый	OK318876	4,008	/1,110	438/1,548	369
	cv. Nesozrevayuschii Natasha (NN-25)	Светло желтый	OK318877	4,007	4,007/1,110	437/1,525	369
<i>S. pimpinellifolium</i>	VIR1018	Красный	OK318858	4,008	4,008/1,110	438/1,459	369
<i>S. cheesmaniae</i>	LA0421	Желтый/оранжевый	OK318859	4,010	4,010/1,110	363/1,394	369
<i>S. chilense</i>	LA2884	Зеленый	OK318865	3,999	3,999/1,110	413/1,313	369
	LA1963	Зеленый	OK318864	3,994	3,994/1,110	413/1,303	369
<i>S. habrochaites</i>	LA1777	Зеленый	OK318860	3,972	3,972/1,110	474/1,398	369
	LA2144	Зеленый	OK318861	4,003	4,003/1,110	473/1,293	369

<i>S. pennellii</i>	LA0716	Зеленый	OK318863	4,006	4,006/1,110	468/1,714	369
	LA1926	Зеленый	OK318862	4,008	4,008/1,110	468/1,714	369
<i>S. peruvianum</i>	LA1954	Зеленый					
<i>S. chmielewskii</i>	LA2663	Зеленый					
<i>S. neorickii</i>	LA2133	Зеленый					
<i>S. arcanum</i>	LA2157	Зеленый					

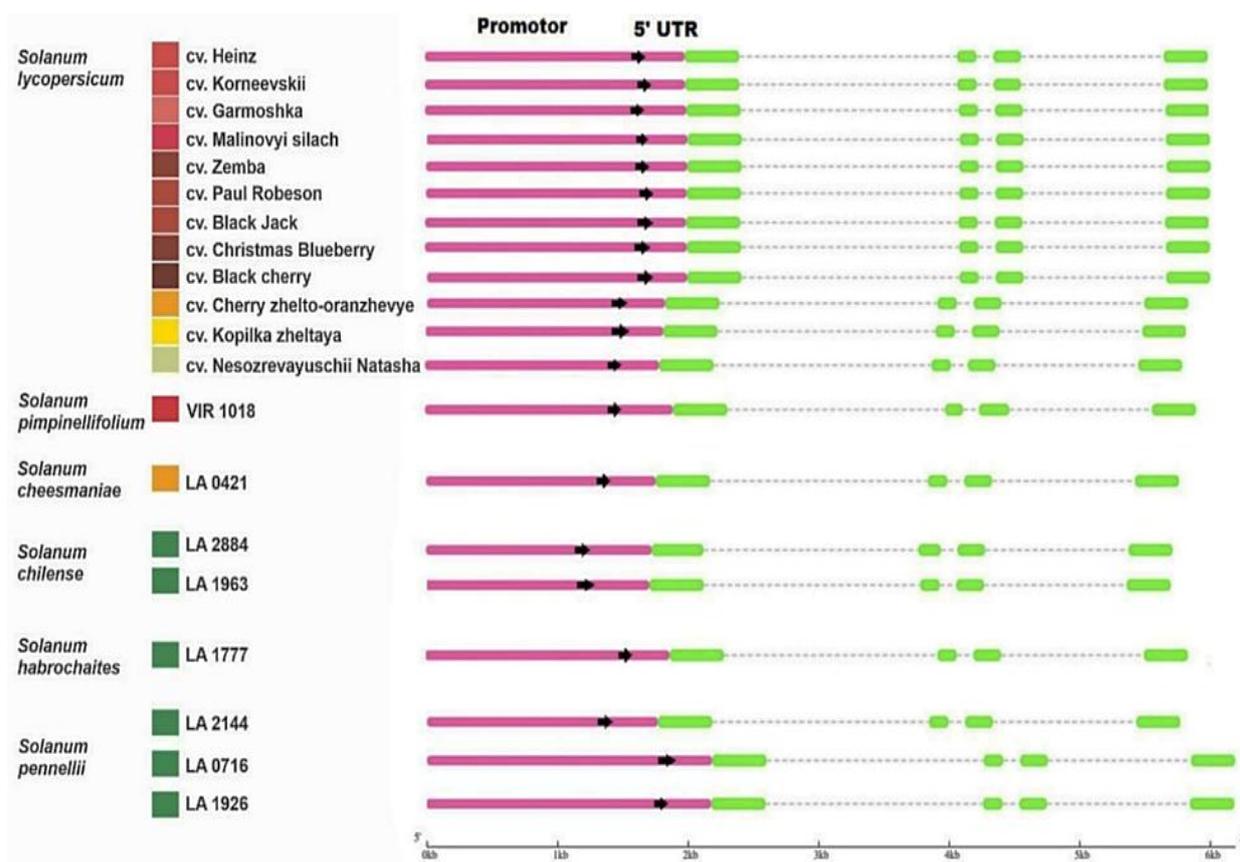


Рисунок 3.3.1 – Структура идентифицированных гомологичных генов *Z-ISO* у дикорастущих видов томата (*Solanum* секц. *Lycopersicon*) и сортов *S. lycopersicum*. В прямоугольниках указаны промоторы/5'-UTR (розовые) и экзоны (зеленые). Квадраты в левом краю рисунка указывают на цвет спелого плода (Efremov et al., 2021).

Интересно, что вариабельность *Z-ISO* у 12 сортов, различающихся окраской спелого плода, была хоть и низкой, в сравнении со всеми дикорастущими видами (5.92%; 240 SNP на 4026 п.н. выровненной последовательности), но при этом она была практически вдвое выше, чем межвидовая вариабельность у красноплодного *S. pimpinellifolium* и желтоплодного *S. cheesmaniae*, как в кодирующей, так и в промоторной областях (табл. 3.2.2).

Анализ вариабельности кодирующих последовательностей идентифицированных генов-гомологов *Z-ISO* показал, что экзоны I, II, III и IV содержали 52, 17, 24 и 25 SNPs соответственно были выявлены как замены, характерные для дикорастущих видов, так и SNP, обнаруженные у сортов. При этом ряд замен (A/C<sub>28</sub>; T/C<sub>618</sub>; C/T<sub>903</sub>; G/C<sub>1042</sub>) были

характерны только для зеленоплодных или красноплодных дикорастущих видов (рис.3.3.2).

Таблица 3.3.2. Варибельность и количество SNPs гомологичных генов Z-ISO в сортах *S. lycopersicum* и дикорастущих видов томата

	Варибельность, (%)				
	Сорта <i>S. lycopersicum</i>	Сорта vs. дикие виды томата	Дикие красноплодные и желтоплодные vs. Heinz	Дикие зеленоплодные виды vs. Heinz	Дикие зеленоплодные виды **
Промотор	6.81	20.00	3.30	12.14	10.57
5'-UTR	6.47	22.00	7.31	10.73	11.36
Ген	5.92	16.00	3.85	7.33	7.78
Кодирующая область	3.96	11.00	1.44	5.78	6.16
Белок	7.03	16.80	2.70	9.19	8.65

Полученные нуклеотидные последовательности гомологов Z-ISO были транслированы.

Сравнительный анализ гомологичных белков Z-ISO показал, что 65 из 118 SNP привели к аминокислотным заменам; среди них три несинонимичных SNP привели к нейтральным заменам аминокислот у дикорастущих видов V104I (желто- и зеленоплодных); H13P/R и T348A (у зеленоплодных видов *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. arcanum*). В экзонах I–IV было выявлено 30, 10, 15 и 10 несинонимичных SNP, соответственно, из которых 25 замен (9, 7, 2 и 7 соответственно в экзонах I–IV) были специфичны для сортов культурного томата, а 43 (24, 3, 13 и 3) — для дикорастущих видов. Наибольшее количество аминокислотных замен было выявлено в Z-ISO зеленоплодных видов *S. pennellii* LA1926 и *S. habrochaites* LA1777, которые считаются эволюционно более древними (Peralta et al., 2001). Среди красноплодных и желтоплодных видов наибольший полиморфизм был свойственен *S. pimpinellifolium* VIR 1080 (рис.3.3.3). Среди сортов, наибольшее количество аминокислотных замен обнаружено для сорта Корнеевский (рис. 3.3.2).

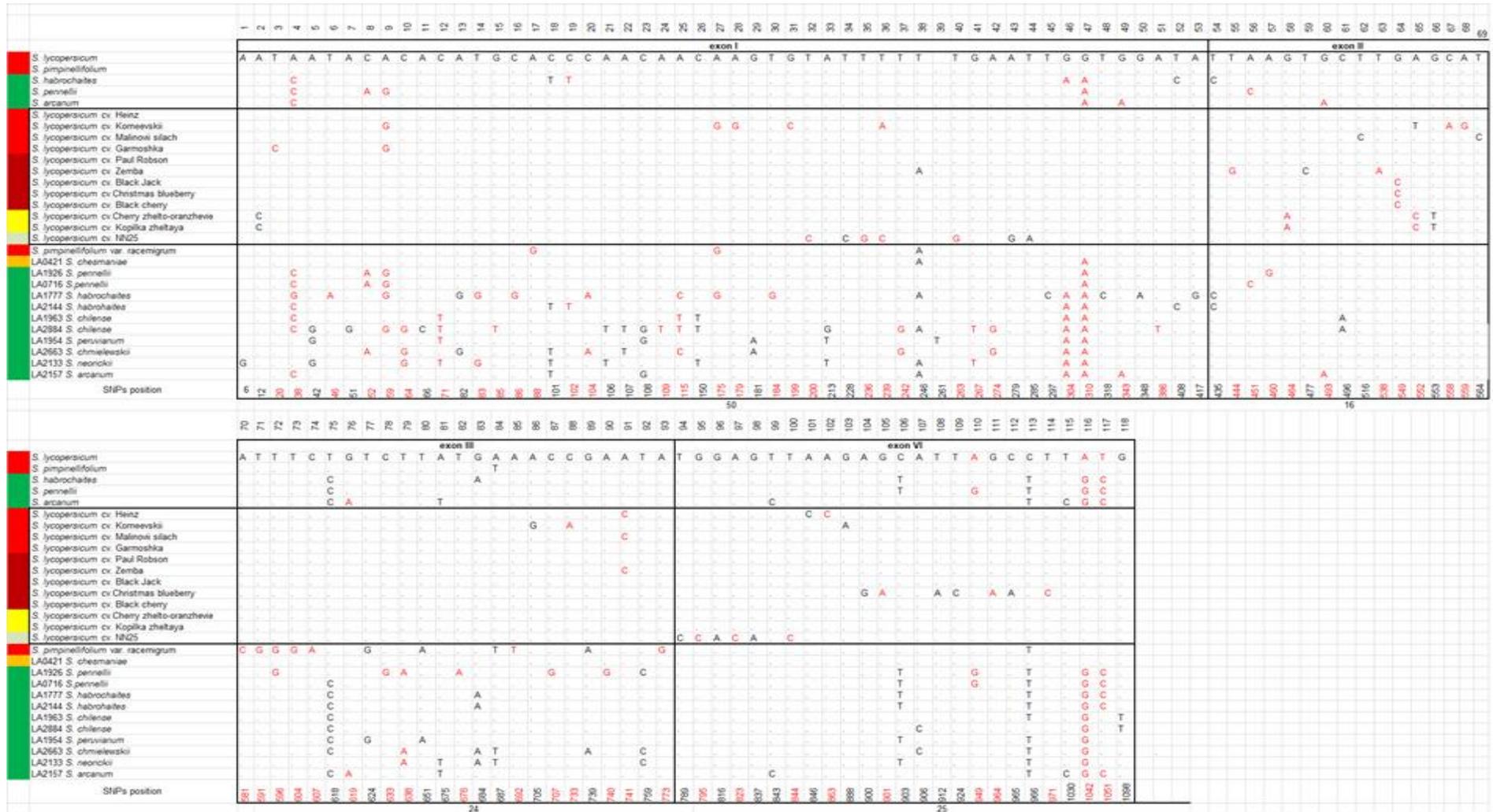


Рисунок 3.3.2 – Вариабельность гомологичных генов Z-ISO у сортов *S. lycopersicum* и дикорастущих видов томата (обозначены только вариабельные сайты). Цвета ячейки слева от видового названия соответствуют цвету зрелого плода.

### 3.3.2. Структурный анализ гомологов Z-ISO у сортов и видов томата секции *Lycopersicon*

Согласно программе PROVEAN, из 65 аминокислотных замен 26 были предсказаны как радикальные и большинство из них были обнаружены в экзоне III 14 у дикорастущих видов радикальные замены были в основном видоспецифичными (например, S154G, H211Q, L213Q, Y226N, A236G и E247G у *S. pennellii* LA1926 или H194P, D197E, W202G и E247K у *S. pimpinellifolium* VIR1081). У сортов радикальные мутации были также специфичны (например, A322N и L324P — у сорта Christmas blueberry, S180T — у сорта Zemba, или S186R — у сорта Корнеевский). Радикальная мутация E247D была обнаружена у нескольких сортов (Heinz, Малиновый силач, Black Jack, Christmas blueberry и Black cherry) (рис. 3.3.3.)

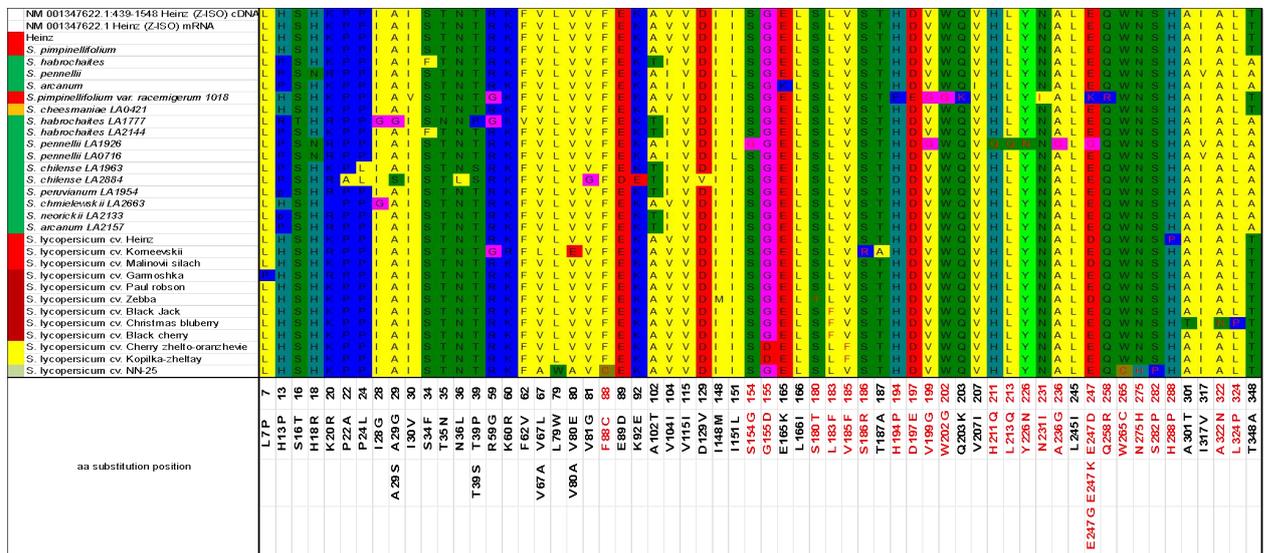


Рисунок 3.3.3 – Полиморфизм гомологов Z-ISO томата. Цифрами указано положение SNP в кодирующих последовательностях Z-ISO (экзоны I–IV); полученные аминокислотные замены в белках Z-ISO показаны ниже. Несинонимичные SNP и радикальные аминокислотные замены, предсказанные PROVEAN, отмечены черным и красным. Цвет спелых плодов указан слева от названия образца (Efremov et al., 2021).

Аминокислотные остатки H153, H269, C266 и D297, которые, как было показано, важны для ферментативной активности Z-ISO как потенциальные сайты связывания активирующих кофакторов были консервативны среди анализируемых образцов томата (Zambrano, 2015).

Согласно прогнозу UniProt для Z-ISO *A. thaliana*, все транслированные гомологи Z-ISO видов томата включали N-концевой транзитный пептид (1–58 а.о.), не содержащий радикальных аминокислотных замен и каталитический домен, соответствующий ферменту Z-ISO (59–369 а.о.) (рис. 3.3.3.). Согласно базе данных консервативных доменов

NCBI (CDD), все анализируемые гомологи содержали домен COG4094 (141–369 а.о.), характерный для мембранных белков суперсемейства NnrU.

Трехмерная (3D) модель гомологов Z-ISO красноплодного сорта Heinz была построена с использованием программы Phyre2 на основе выбранных сходных кристаллических структур ICMT *Methanosarcina acetivorans*, дрожжевого мембранного белка. В целом удалось смоделировать 49% остатков (часть каталитического домена Z-ISO) с достоверностью более 90%; 189 остатков были смоделированы *ab initio*. Согласно построенной модели фермент Z-ISO имеет спиральную топологию и предсказанные трансмембранные спирали были построены с высокой достоверностью: S1 (97–116 а.о.), S2 (139–157 а.о.), S3 (172–191 а.о.), S4 (210–234 а.о.), S5 (258–273 а.о.), S6 (277–294 а.о.) и S7 (340–363 а.о.). Участки, богатые цитозином (116–139 а.о., 191–210 а.о., 273–277 а.о. и 363 а.о. – С-конец), могут образовывать карман для связывания кофактора, расположенный в основании трансмембранных спиралей.

Схожие структуры были получены для наиболее переменных гомологов Z-ISO зеленоплодных видов *S. pennellii* LA1926, *S. chilense* LA2884 и *S. habrochaites* LA1777. Однако, несмотря на аминокислотные замены, никаких специфических структур, которые бы отличали 3D белок у зеленоплодных и красноплодных видов не выявлено.

Анализ консервативных мотивов с использованием программы MEME 7.0.26 позволил выявить в исследуемых белках Z-ISO томата, родственных видов Solanaceae и арабидопсиса 12 достоверных мотивов (рис. 3.3.5) как видов томата, так и других родов Solanaceae. 8 мотивов (1-8), включающих мотивы каталитического домена, были общими у белков видов томата и *Arabidopsis*. Основные отличия касались консенсусных паттернов в N-концевом транзитном пептиде. Все белки Z-ISO у видов томата аналогичны другим Solanaceae и характеризовались наличием специфических последовательностей 42 ак (мотив 9) и 15 ак (мотив 12), которые отсутствовали у арабидопсиса (рис 3.3.4).

Таким образом, несмотря на различия в окраске плодов, все идентифицированные гомологи Z-ISO характеризовались минорными отличиями в аминокислотной последовательности и одинаковой структурой. Следовательно, разница в цвете плодов может быть связана с дифференциальной регуляцией экспрессии Z-ISO.

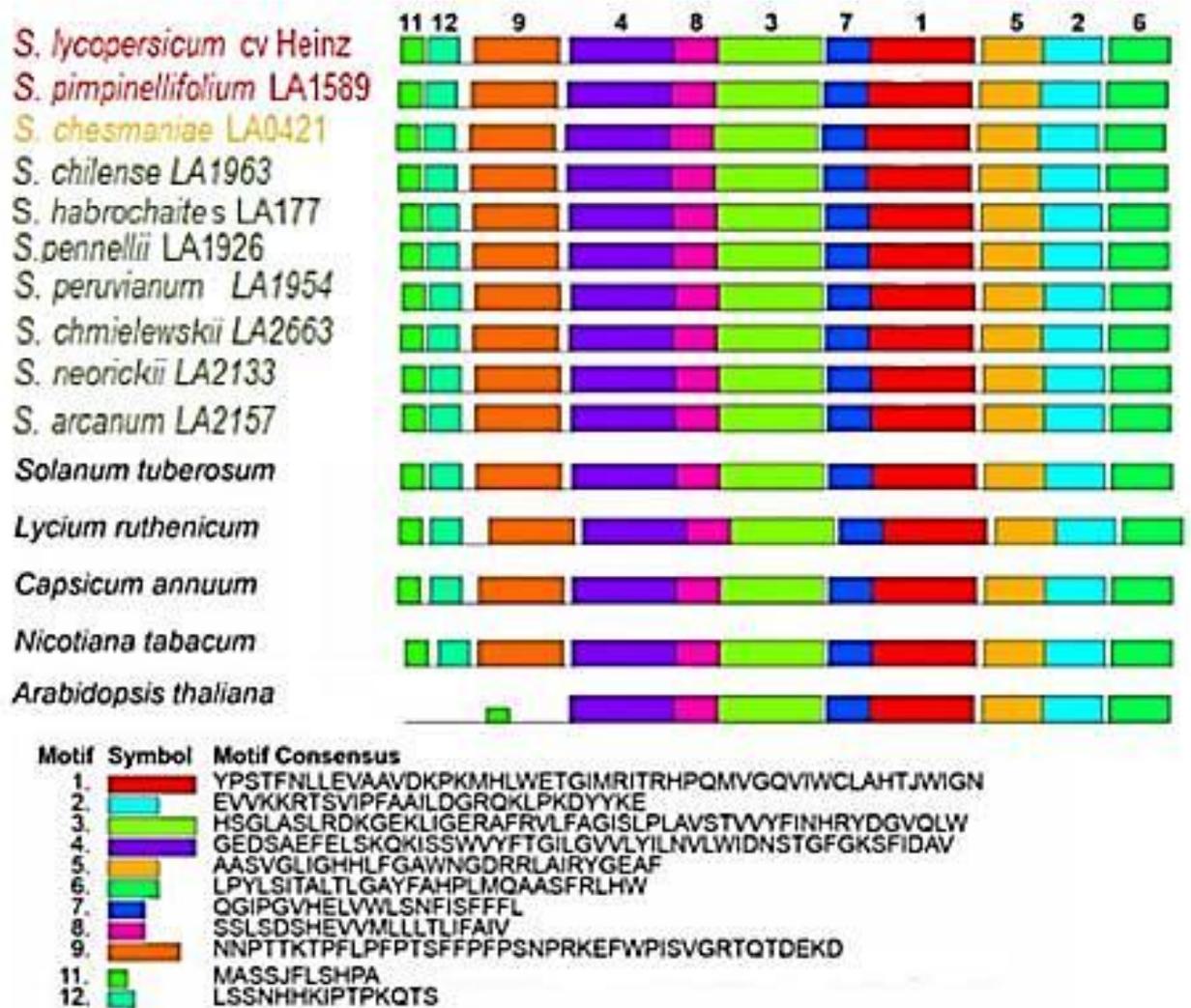


Рисунок 3.3.4 – Распределение консервативных мотивов у гомологов Z-ISO видов Solanaceae и других семейств, идентифицированных с помощью MEME 7.0.26. Порядок мотивов соответствует их положению в белке.

### 3.3.3. Экспрессия Z-ISO в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции *Lycopersicon*

Так как ранее транскрипция Z-ISO практически для томата не была исследована (только на стадии зрелого плода у нескольких красноплодных сортов), то в первую очередь представлялось необходимым оценить транскрипцию этого гена *in silico*. Уровни экспрессии Z-ISO определялись в различных тканях (корнях, листьях, почках, цветках, плодах и семенах) в сортах Heinz 1706 и M82 *S. lycopersicum*, а также красноплодном виде *S. pimpinellifolium* LA1589 на основе транскриптомных данных, представленных на ресурсах TomExpress и SGN-TEA. Поскольку плод является органом наиболее обогащенным каротиноидами, проведенный анализ экспрессии Z-ISO был более подробным, чем в других тканях, и включал 11 частей/тканей плода (от наружного эпидермиса до семян), проанализированных на 16 стадиях развития (от цветения до RR).

Проведенный *in silico* анализ показал, что *Z-ISO* экспрессировался во всех тканях растения томата, с максимальным уровнем в плодах на стадиях BR и RR (рис. 3.3.5).

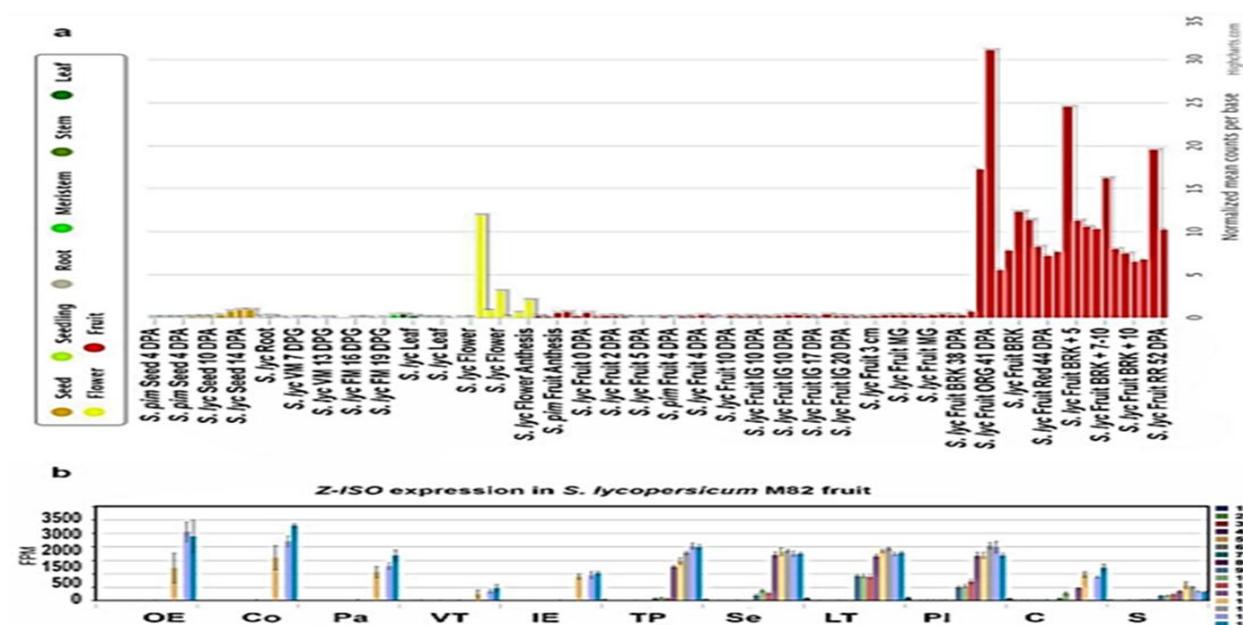


Рисунок 3.3.5 – Паттерны экспрессии *Z-ISO* у красноплодных образцов. (а) Схема экспрессии *Z-ISO* у *S. lycopersicum* (*S. lyc*) и *S. pimpinellifolium* (*S. pim*) (TomExpress, <http://tomexpress.toulouse.inra.fr>). Транскрипцию генов анализировали в корнях, листьях, меристемах (вегетативной меристеме, VM; цветочной меристеме, FM), цветах, плодах, на стадиях (IG; MG; BR, ORG, RR) и семенах. DPA, количество дней после опыления; DPG, количество дней после прорастания (SGN-TEA <https://tea.solgenomics.net>).

Более низкая экспрессия была в цветах и семенах через 14 дней после опыления; в меристемах, корнях и на самых ранних стадиях развития плодов детектировались следовые количества транскриптов.

### 3.3.4. Анализ экспрессии *Z-ISO* у красно-, желто- и зеленоплодных видов томата

Так как *in silico* была выявлена максимальная транскрипция *Z-ISO* преимущественно в генеративных органах, то для более детального анализа экспрессии *Z-ISO* у красно-, желто- и зеленоплодных видов томата оценивали в органах цветка (чашелистики, лепестки, тычинки, завязь) у *S. lycopersicum* (сорта Heinz, Корнеевский, Копилка желтая) и дикорастущих видов томата (желтоплодного *S. cheesmaniae* LA0421 и зеленоплодных *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716), а также на большей выборке образцов в листьях и плодах на различных стадиях созревания (IG, MG, BR и RR/FR) у восьми видов. *S. cheesmaniae* LA0421, *S. habrochaites* LA2144, *S. pennellii* LA0716, *S. peruvianum*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. arcanum* и трех сортов *S. lycopersicum* (Heinz, Корнеевский, Копилка желтая) (рис.3.3.7). Окраска лепестков и тычинок у красноплодных и зеленоплодных видов была одинаково желтой.

Несмотря на то, что у всех видов томата лепестки венчика и тычинки имеют желтую окраску и визуально не отличаются, окраской, транскрипция в лепестках и тычинках была в 8-12 выше у красноплодных видов, чем у зеленоплодных с максимумом экспрессии в лепестках венчика. Интересно, что максимальная экспрессия *Z-ISO*, превосходящая таковую даже у сортов, детектировалась у образца *S. cheesmaniae*, несмотря на сходную окраску лепестков у всего образцов томата. У зеленоплодных видов *Z-ISO* транскрибировался на достаточно низком уровне (рис.3.3.6), в том числе и в лепестках венчика. Уровень экспрессии в чашелистиках был низким у всех видов и сопоставим с таковым в других фотосинтезирующих органах (листьях).

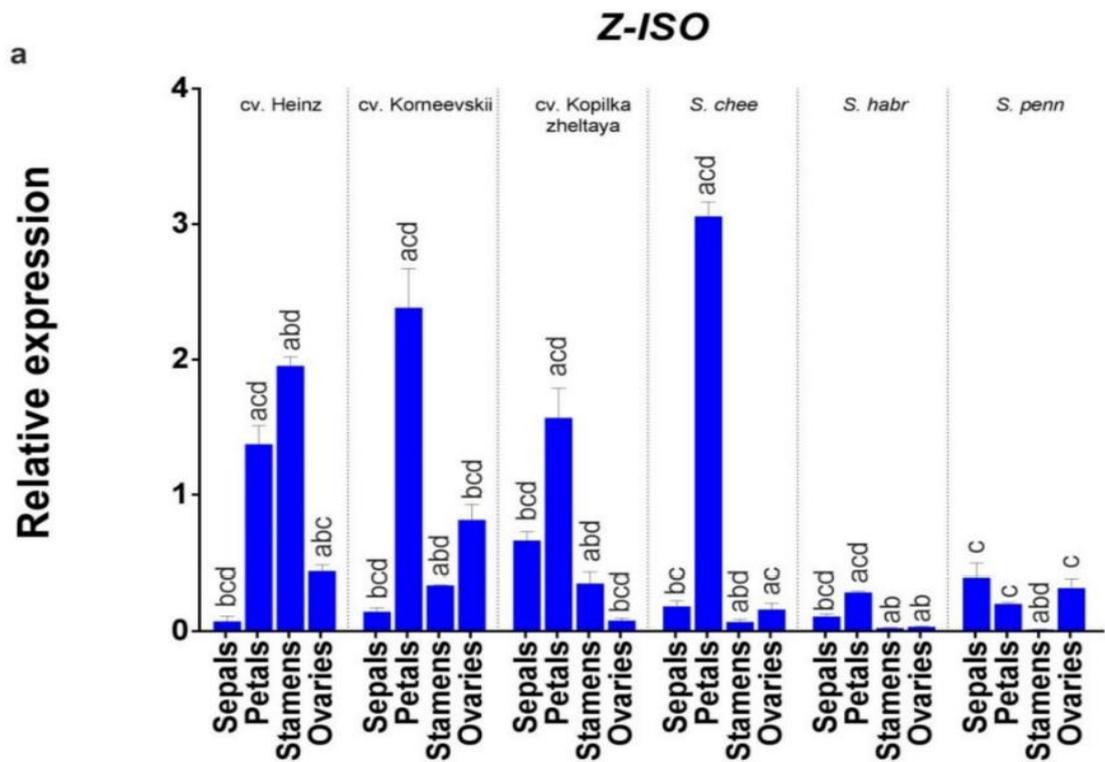


Рисунок 3.3.6 – Сравнение экспрессии *Z-ISO* в сортах *S. lycopersicon* (Heinz, Корнеевский, Копилка желтая) и дикорастущих видах (*S. habrochaites* LA2144, *S. pennellii* LA0716) в органах цветка: чашелистики (sepals), лепестки (petals), тычинки (stamens), завязь (ovaries). Строчные буквы показывают статистически достоверные различия ( $p < 0.005$ ) между экспрессией в одних органах разных образцов (Efremov et al., 2021).

Транскрипция *Z-ISO* в листьях у всех анализируемых видов (за исключением сорта Heinz) была низкой вне зависимости от цвета зрелых плодов (рис.3.3.8).

Так как ранее транскрипция *Z-ISO* была определена только у сортов томата в стадии полной спелости, то нам представлялось интересным провести более детальный анализ изменения экспрессии *Z-ISO* в динамике созревания плода (стадии IG, MG, BR и

RR/FR) как у красноплодных образцов *S. lycopersicon* и *S. pimpinellifolium*, так и у желтоплодного *S. cheesmaniae* и пяти зеленоплодных видов.

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 желтоплодным *S. cheesmaniae* и зеленоплодными видами. При этом транскрипция *Z-ISO* на стадиях BR и RR имела разную динамику, увеличиваясь по мере созревания у красноплодных сортов и желтоплодного *S. cheesmaniae*, но снижались у сорта Копилка желтая (рис. 3.3.7).

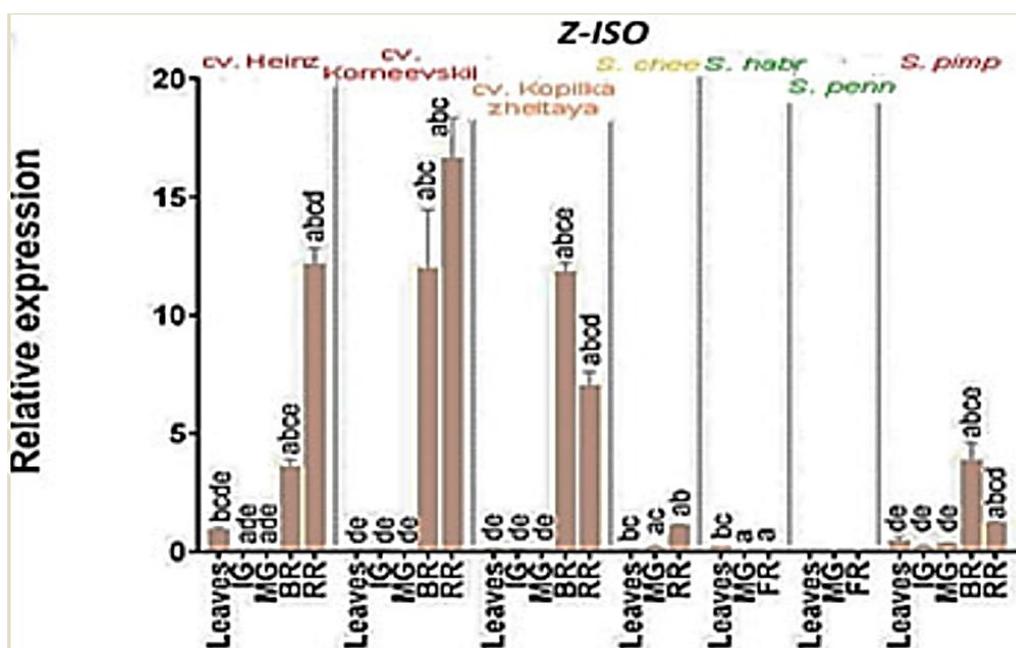


Рисунок 3.3.7 – Сравнение экспрессии *Z-ISO* в листьях и плодах (стадии IG, MG, BR и RR/FR) в сортах *S. lycopersicum* (Heinz, Корнеевский, Копилка желтая), *S. cheesmaniae* LA0421, *S. habrochaites* LA2144, *S. pennellii* LA0716, *S. peruvianum*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. arcanum*. Строчные буквы показывают статистически достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между экспрессией в одних органах разных образцов (Efremov et al., 2021).

### 3.3.5. Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии *Z-ISO*

Проведенный биохимический анализ показал, что по мере созревания плодов содержание каротиноидов увеличивалось у всех проанализированных образцов, кроме желтоплодного сорта Копилка желтая и *S. cheesmaniae*, у которых общее количество каротиноидов изменялось незначительно (рис. 3.3.8). В плодах дикорастущих желтоплодного и зеленоплодных видов томатов отсутствовал ликопин, и они содержали в 25–30 раз меньше общих каротиноидов, чем плоды сортов *S. lycopersicum* и *S. pimpinellifolium*. В плодах содержание  $\beta$ -каротина было сходным у всех анализируемых образцов (рис. 3.3.8).

Сравнение содержания каротиноидов в спелых плодах у анализируемых видов томата с экспрессии *Z-ISO* выявило зависимость: самый высокий у *S. lycopersicum*, умеренный у *S. cheesmaniae* и самый низкий у зеленоплодных *S. habrochaites* и *S. pennellii* (рис. 3.3.8). Помимо корреляции с содержанием каротиноидов в зрелых плодах, также была выявлена положительная зависимость между содержанием каротиноидов в процессе созревания плода и уровнями транскрипции *Z-ISO*. Таким образом, содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется уровнем экспрессии *Z-ISO*, определяя количество бесцветных предшественников окрашенных каротиноидов.

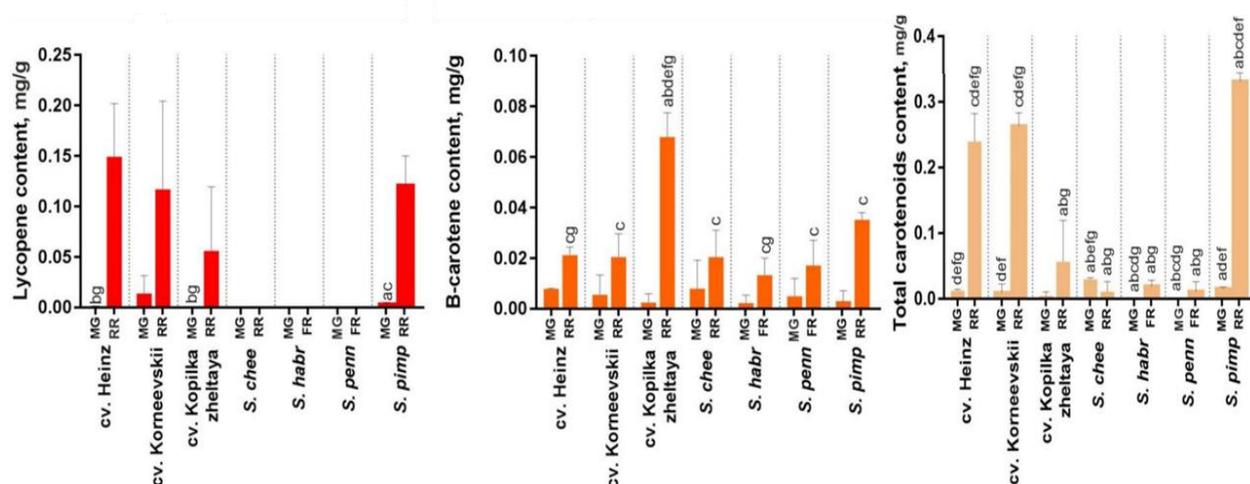


Рисунок 3.3.8 – Содержание каротиноидов (а–в) в плодах на стадии MG и RR/FR у красноплодных *S. lycopersicum* (сорта Heinz, Корнеевский, Копилка желтая), *S. pimpinellifolium* VIR1018 (*S. pimp*), желтоплодном *S. cheesmaniae* LA0421 (*S. chee*) и зеленоплодных видах, *S. habrochaites* LA2144 (*S. habr*), *S. pennellii* LA0716 (*S. penn*). Строчные буквы показывают статистически достоверные различия ( $p < 0.005$ ) между содержанием каротиноидов в одной и той же ткани разных образцов.

Как указывалось выше, несмотря на различия в окраске плодов, все идентифицированные гомологи *Z-ISO* у видов томата характеризовались одинаковой структурой (рис. 3.3.4–3.3.6). Учитывая консервативную структуру *Z-ISO*, разница в окраске зрелых плодов может быть связана с дифференциальной регуляцией экспрессии *Z-ISO*. Ранее было показано, что высокая экспрессия *Z-ISO* соответствует повышенному содержанию общих каротиноидов и  $\alpha/\beta$ -каротинов в цветках и листьях чистотела *Chelidonium majus* (Sathasivam et al., 2021), тогда как его низкая экспрессия приводит к обесцвечиванию плодов, что ранее было показано для апельсина *C. sinensis* (Rodrigo et al., 2019) и отсутствие экспрессии *Z-ISO* коррелирует с отсутствием окрашенных каротиноидов и накоплением бесцветных фитоена и фитофлуена. Полученные нами данные говорят о том, что уровень экспрессии *Z-ISO* положительно коррелировал с

содержанием каротиноидов в плодах томата (рис. 3.3.7, 3.3.8). В то же время разницы в уровне экспрессии *Z-ISO* в лепестках цветов не было. Это может быть связано с тем, что лепестки, независимо от вида томата, имеют желтый цвет из-за накопления в хромопластах в основном ксантофиллов.

### 3.3.6. Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) гена *Z-ISO* у красноплодного и зеленоплодных видов томата

Помимо кодирующих последовательностей были проанализированы последовательности промоторной области и 5' UTR *Z-ISO* двух видов красноплодного сорта Heinz *S. lycopersicum* и зеленоплодного *S. pennellii* LA0716 на наличие цис-регуляторных элементов в промоторе (1,5–1,6 т.п.н.) и 5' UTR (363–473 п.н.). Длину регуляторной области выбирали исходя из размера предсказанного промотора гена *Z-ISO* (AT1G10830.1) *A. thaliana* (1,2 т.п.н.).

В анализируемой регуляторной области генов *Z-ISO* был обнаружен 131 цис-регуляторный элемент, в том числе 18 светочувствительных, 30 гормон-чувствительных и 18 стресс-чувствительных элементов. Остальные элементы представляли собой сайты связывания факторов транскрипции (WRKY, MYB, ARR1, DOF, RAV1, bZIP, MADS и др.) (табл.3.3.3) (Бабак и др., 2019; Бабак и др., 2020). Были идентифицированы цис-регуляторные элементы, выполняющие разные функции, а также элементы с неизвестной ролью. Среди идентифицированных регуляторных элементов три светочувствительных (TCCC-motif, chs-CMA1a и Box 4), пять гормончувствительных (ABRE3a, ABRE4, ERELEE4, CATATGGMSAUR и TGA-box) и два стресс-чувствительных (ANAERO3CONSENSUS и PREATPRODH) отсутствовали в промоторе *Z-ISO* *S. lycopersicum* (рис. 3.3.9).

Видоспецифичные различия в экспрессии *Z-ISO* могут быть связаны с полиморфизмом промотора и 5' UTR, о чем свидетельствует значительная вариабельность соответствующих областей у дикорастущих зеленоплодных видов томата, у которых уровень полиморфизма промотора и 5' UTR был в 1,38–1,58 раза выше, чем у сортов (табл. 3.3.3). Наблюдалась вариабельность последовательностей промоторов *Z-ISO* у культурных сортов (6,81%) (табл. 3.3.3). по сравнению с сортом Heinz. В то же время ранее сообщалось, что промоторы других генов биосинтеза каротиноидов (*GGPPS1*, *PSY2*, *PDS*, *ZDS*, *PSY1*, *CrtISO*, *LYC-b* и *LYC-e*) идентичны на 97–100% (Koul et al., 2019).

Ранее также было установлено, что промоторы *PSY1*, *CRTISO* и *LYCB* содержат сайты связывания MADS-транскрипционных факторов (Koul et al., 2019), и было показано, что MADS-RIN напрямую регулирует экспрессию *PSY1*, *Z-ISO* и *CRTISO* путем

связывания с промоторами (Fujisawa et al., 2013; Slugina 2021). В промоторе *Z-ISO* как *S. pennellii* LA0716, так и *S. lycopersicum* были обнаружены сайты, необходимые для связывания MADS-транскрипционных факторов. Также показано, что промотор *Z-ISO* *S. pennellii* содержал значительно меньше сайтов связывания MYB и bZIP транскрипционных факторов, но больше сайтов связывания для WRKY и ARR1 транскрипционных факторов, чем промотор *S. lycopersicum* (рис.3.3.9) (Бабак и др., 2019). Ранее анализ промотора и 5' UTR гена *PSYI* у красноплодного и зеленоплодного вида показал, что в промоторе содержится 37 различных регуляторных элементов, указывающих на зависимость экспрессии *PSYI* от многих факторов (Qin et al., 2011). Проведённый нами анализ промотора и 5' UTR *Z-ISO* у красноплодного и зеленоплодного вида показал наличие гораздо большего числа разнообразных регуляторных элементов, связанных со светом, гормонами и стрессами.

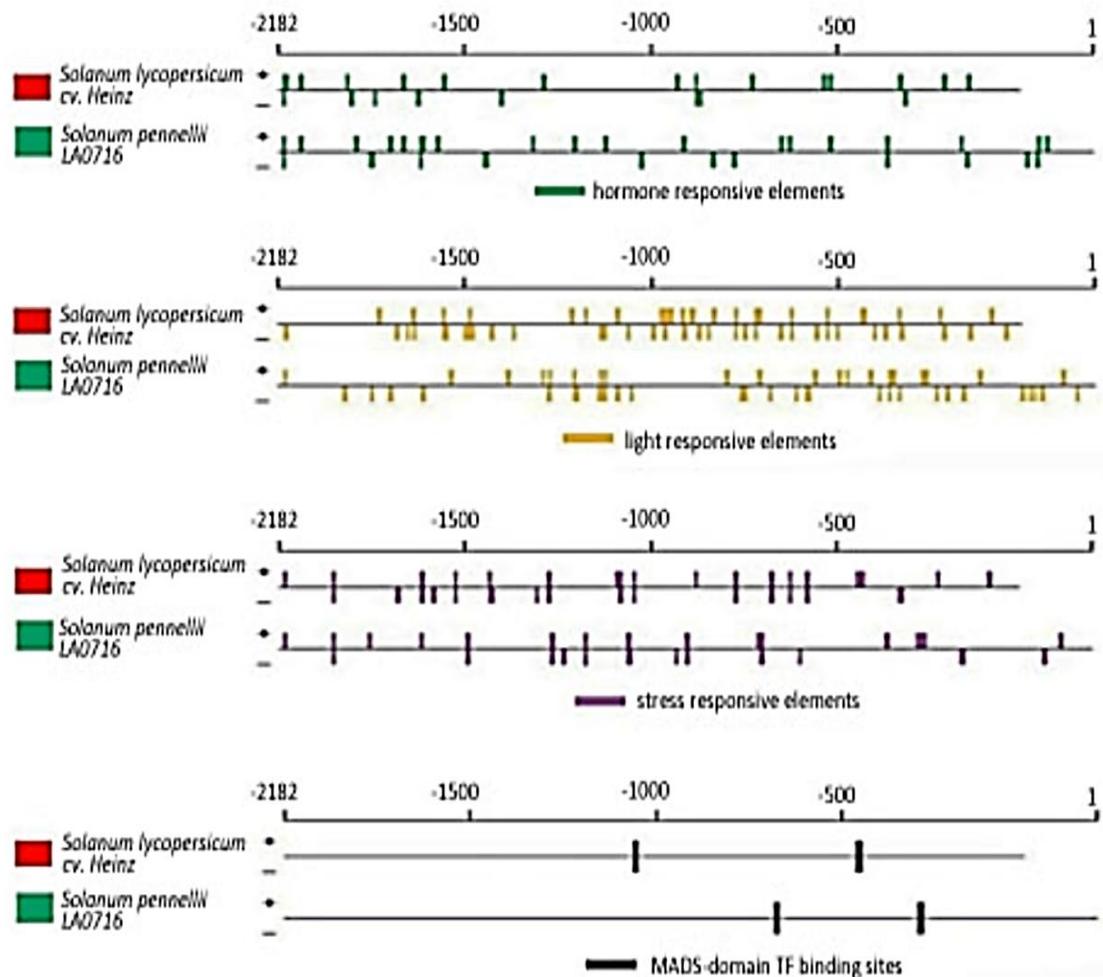


Рисунок 3.3.9 – Регуляторные элементы, идентифицированные в промоторных последовательностях *S. lycopersicum* сорта Heinz 1706 (FSCV) и *S. pennellii* LA0716 гена *Z-ISO*. Красные и зеленые квадраты соответствуют окраске плодов анализируемых образцов томатов.

Таблица 3.3.3. Регуляторные элементы в промоторе и 5'-UTR гена Z-ISO *S. lycopersicum* и о *S. pennellii*.

Название элемента	Последовательность	<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz Промотор / 5'-UTR - 1549 / 438 bp		<i>S. pennellii</i> LA0716 Промотор / 5'-UTR - 1714 / 468 bp		Описание
		цепь	Расположение	Цепь	расположение	
TCCC-motif	TCTCCCT		Nd	-	192	Свето-чувствительные элементы
chs-CMA1a	TТАCTTAA		Nd	-	1696	
INRNTPSADB	YTCANTYY			-	1413	
Box 4	ATTAAT		nd	-	1407	Консервативная последовательность светорегулируемых генов. Реакция на абиотический стресс
I-box	atGATAAGGTC	+	1527		nd	
ABRE3a	TACGTG		nd	+	874	Сайты связывания факторов AREB/ABF.
ABRE4	CACGTA		nd	-	874	
ERELEE4	AWTTCAAA		nd	-	173	Этилен-чувствительные элементы
ARFAT	TGTCTC	-	1479		nd	Ауксин-чувствительные элементы
CATATGGMSAUR	CATATG		nd	-	364	
				+	364	
TGA-box	TGACGTAA		nd	+	1631	
SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	-	1479		nd	Стресс-чувствительные элементы
ANAERO3CONSENSUS	TCATCAC		nd	-	1445	Необходимы для анаэробной индукции
PREATPRODH	ACTCAT		nd	+	312	PRE элемент
WBBOXPCWRKY1	TTTGACY		nd	+	1359	Сайт связывания WRKY TF
MYBCORE	CNGTTR	+	431		nd	Сайты связывания MYB TF
		+	1016			
MYBATRD22	CTAACCA	-	502		nd	
MYB1LEPR	GTTAGTT	+	504		nd	
MYCATERD1 (Responses to abiotic stresses.)	CATGTG		nd	-	1393	
MYCATRD22	CACATG		nd	+	1393	
TATAPVTRNALEU	TTTATATA	+	927		nd	Основной промоторный элемент

EMHVCHORD	TGTAAAGT	-	184	nd		Стресс-чувствительный элемент
CGCGBOXAT	VCGCGB	-	1068	nd		
		+	1068			
ACGTABOX	TACGTA	-	1223	nd		Многофункциональные
		+	1223			
CGACGOSAMY3	CGACG	+	1369	nd		Элемент CGACG, обнаруживается в богатых GC регионах
SEF1MOTIF	ATATTTAWW	+	1454	nd		
QELEMENTZM13	AGGTCA	+	1533	nd		Q (количественный)-элемент в промоторе гена ZM13 кукурузы. Участвует в усилении экспрессии.
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	nd		+	225	Может играть роль в подавлении активности промоторов RPS1 и RPL21
				+	1092	
TBOXATGAPB	ACTTTG			+	1553	
S1FSORPL21	ATGGTATT	nd		+	225	
RYREPEATLEGUMINBOX	CATGCAY	nd		-	348	
RYREPEATGMGY2 (RY repeat motif)	CATGCAT	nd		-	348	
RYREPEATBNNAPA (ABA inducible RY/G box)	CATGCA	nd		-	349	
LEAFYATAG (root-preferential expression)	CCAATGT	nd		+	893	
L1BOXATPDF1 (growth and development)	TAAATGYA	nd		-	1611	
MARABOX1	AATAAAYAAA			-	2084	
HEXMOTIFTAH3H4 (hormonal regulation)	ACGTCA	nd		-	1631	
AUXRETGA1GMGH3 (auxin response)	TGACGTAA	nd		+	1631	
CARE	CAACTCCC	+	533	nd		
TCA	TCATCTTCAT	+	621	nd		
		-	1210			
-300CORE	TGTAAAG	-	185	nd		

Однако существенных отличий в промоторе и 5' *UTR* у видов с различной окраской спелого плода выявлено не было, что указывает на высокую степень консервативности элементов, регулирующих транскрипцию *Z-ISO*.

Кроме того, промоторы отличались наличием регуляторных элементов с неизвестной или плохо охарактеризованной функцией. Такое различие в структуре промотора может объяснить различия в уровнях экспрессии *Z-ISO* между красноплодными и зеленоплодными томатами. Интересно, что в промоторе *Z-ISO S. pennellii* наблюдались элементы, чувствительные к этилену, тогда как в промоторе *S. lycopersicum* их число было значительно меньше. Этилен играет ключевую роль в созревании климактерических плодов, к которым относится томат, и участвует в регуляции роста и развития растений (Liu et al. 2015). Кроме того, этилен принимает участие в ответных реакциях растений на различные биотические и абиотические стрессы. Таким образом, наличие меньшего количества этилен-, стресс- и светочувствительных элементов в промоторе *Z-ISO* культурного томата по сравнению с диким *S. pennellii* может быть связано с повышенной способностью дикорастущих видов реагировать на стрессовые условия, в том числе в период созревания плодов. Превращение хлоропластов в хромопласты, содержащие каротиноиды имеет важное значение для процесса созревания плодов томатов и является основным фактором окрашивания плодов томата (Kilambi et al., 2017; Osorio 2019). *Z-ISO* определяет переход от бесцветных каротиноидов к цветным, что способствует окраске спелых плодов у красноплодных, желтоплодных и различию их от зеленоплодных видов томата.

#### **3.4. Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов каротин-cis-trans-изомеразы *CRTISO* в сортах и дикорастущих видах томата**

Каротин-cis-trans-изомеразы (каротиноид-изомеразы) *CRTISO*, также считающаяся одним из основных ферментов каротиногенеза в плодах томата, катализирует реакцию цис-транс-изомеризации, что приводит к образованию из проликопина all-trans-ликопина, который является основным каротиноидом у красноплодных томатов и субстратом для последующих реакций циклизации с образованием  $\alpha/\beta$ -каротинов и их производных (Isaacson et al., 2004; Yu et al., 2011, Yoo et al., 2017). Показано восстановление биосинтеза каротиноидов в мутантах томата и повышение содержания каротиноидов в трансгенных растениях табака при сверхэкспрессии гена *CRTISO* (Zhang et al., 2013; Li et al., 2020). Также показано участие *CRTISO* в реакции на стрессы (Shi et al., 2014).

Было обнаружено, что у большинства видов растений ген *CRTISO* является однокопийным (Isaacson et al., 2002; Just et al 2007; Wei et al., 2010; Chai et al 2011). Однако у апельсина *C. sinensis* были идентифицированы и функционально охарактеризованы четыре гомолога *CRTISO*, а у арабидопсиса - три (Zhang et al., 2013, Pinheiro et al., 2019). У сорта томата MicroTom также было выявлено три гомолога каротиноид-изомеразы: *CRTISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* (Pinheiro et al., 2019). При этом ни последовательностей, ни характеристики этих генов у других видов или сортов томата не было.

3.4.1. Идентификация, структурный анализ и характеристика варибельности гомологичных генов *CRTISO* (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*) у образцов томата

Нами были определены и охарактеризованы последовательности кДНК генов каротин-cis-trans-изомераз *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* у красноплодных видов *S.lycopersicum* (сорт Heinz) и *S.pimpinellifolium* (LA0480), желтоплодного *S. cheesmaniae* (LA0421) и двух зеленоплодных. видов *S. habrochaites* (LA2144), *S. pennellii* (LA0716) (рис.3.4.1).

<b>CRTISO</b>		23	90	111	120	122	159	203	237	244	247	251	252	258	258	408	441	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	C	T	T	G	A	A	A	T	C	T	G	A	C	C	G	C	G	A	T	T	C	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	A	T	C	T	G	A	C	C	G	C	G	A	T	T	C	T	C	T	T	T	A	A	C		
	<i>S. cheesmaniae</i>	T	T	T	G	G	A	C	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	A	A	G	C	C	T	G	A	C	C	G	C	A	T	T	C	C	C	C	A	A	A	C	C		
	<i>S. habrochaites</i>	T	C	C	C	G	C	C	C	C	G	C	C	C	T	C	A	A	G	G	C	C	T	A	G	A	C	C	G	A	A	T	T	C	C	C	C	A	A	G	A	C		
	<i>S. pennellii</i>	T	T	T	G	G	C	C	T	G	C	C	C	C	T	A	A	A	A	C	T	T	A	A	C	T	A	C	T	A	G	T	T	C	C	C	C	C	A	A	G	C	G	
		8YF			L40F	I41R		T88I			V82M	E83Q	S84T						I205V				R274Q	S307G		A333S	L344I	S351C	V362A		N400N	D421E								L607V				
<b>CRTISO-L1</b>		65	72	84	463	555	564	618	648	744	728	838	854	900	906	1190	1230	1218	1311	1339	1359	1432	1410	1440	1623	1715	1776	1806	1809	1854	1878	1977												
	<i>S. lycopersicum</i>	G	G	A	G	G	C	C	C	T	T	C	C	T	T	A	T	A	T	G	A	G	C	G	T	T	A	T	G	G	A	G	T											
	<i>S. pimpinellifolium</i>	G	G	A	A	G	C	C	C	T	T	C	C	T	T	A	T	A	T	G	A	G	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	T	C	C	T	T	A	T	A	T	G	A	G	C	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	A	T	C	G	G	T	C	C	T	T	G	C	G	A	G	A											
	<i>S. pennellii</i>	A	G	T	A	A	C	T	T	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	G	C	C	C	G	C	T	A	A	G	A	A													
		R22K		E28D	E155K						V276A	A285V				L397R				V445I			K478E			E572V	D592E																	
<b>CRTISO-L2</b>		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	A	G	T	A	T	C	T	C	C	G	G																			
	<i>S. pimpinellifolium</i>	G	T	A	G	A	A	C	T	T	C	C	A	A	A	G	T	A	T	C	T	C	C	A	A																			
	<i>S. cheesmaniae</i>	A	T	A	G	A	A	C	T	T	C	T	A	A	A	G	T	G	T	C	T	C	C	A	A																			
	<i>S. habrochaites</i>	A	T	A	G	A	G	T	T	C	A	A	T	A	A	G	T	G	T	C	C	C	C	T	G																			
	<i>S. pennellii</i>	A	T	G	A	C	A	A	C	C	A	A	T	G	A	A	G	T	T	C	G	G	T	G																				
		V5F	N15S								Q169N	Q169H		K175R	R179Q		K293E		R394C		I459M	R512W	R577H																					

Рисунок 3.4.1 – Уровень полиморфизма идентифицированных гомологов гена *CrtISO* у пяти видов томата. Цифры обозначают положение SNP в кодирующих последовательностях гена *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2* (экзоны I–VI), по сравнению с последовательностью *S. lycopersicum*; аминокислотные замены в белках приведены ниже.

Сравнение полученных кДНК последовательностей образцов пяти видов томата с последовательностями генов *S. lycopersicum CrtISO* (Solyc10g081650), *CrtISO-L1* (Solyc05g010180) и *CrtISO-L2* (Solyc07g021640), представленных в базе NCBI, показали,

что все они имели одинаковую экзон-интронную структуру и длину кДНК – 1848 п.н. (*CrtISO*), 1926 п.н. (*CrtISO-L1*), 2031 п.н. (*CrtISO-L2*) и белков 611, 642 и 677 а.о., соответственно. Общий уровень межвидового полиморфизма кодирующих последовательностей составил 1.50-2.00%. Сравнение нуклеотидных замен в составе последовательностей кДНК трех генов каротиноид-изомеразы *S. pimpinellifolium* LA0480, *S. cheesmaniae* LA0421, *S. habrohaites* LA2144 и *S. pennellii* LA0716 в сравнении с сортом Heinz выявило 39 (*CrtISO*), 31 (*CrtISO-L1*), 22 (*CrtISO-L2*) SNPs; индели отсутствовали (рис.3.4.1). В сравнении с образцом *S. lycopersicum* наибольшее число SNPs в последовательности генов-гомологов *CrtISO* было выявлено у *S. cheesmaniae*, *S. habrohaites* и *S. pennellii* по 17, 17 и 19 соответственно. Ген *CrtISO-L1* у *S. habrohaites* и *S. pennellii* был наиболее полиморфным с 21 и 22 SNPs, тогда как у *S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae* было выявлено лишь по 6 и 7 SNPs. Анализ полиморфизма *CrtISO-L2*, показал, что у зеленоплодных видов *S. habrohaites* и *S. pennellii* было выявлено по 18 SNPs, тогда как у двух красноплодных видов было детектировано только 3 SNPs.

Полученные последовательности трех генов анализируемых видов томата (*CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2*) были транслированы и проанализированы для оценки степени сходства между полученными белковыми последовательностями. Самый высокий уровень гомологии был показан для белков *CrtISO* и *CrtISO-L1* - 68,8% сходства. Степень гомологии между *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* составила 59,0%, тогда как наименьшая степень сходства была выявлена между *CrtISO* и *CrtISO-L2* - 55,0%. Всего в сравнении с *S. lycopersicum* у дикорастущих зеленоплодных видов было выявлено 15 аминокислотных замен, характерных для *CrtISO* (9 у *S. habrohaites* и 6 у *S. pennellii*), 13 - для *CrtISO-L1* (6 у *S. habrohaites* и 7 *S. pennellii*) и 10 - для *CrtISO-L2* (6 у *S. habrohaites* и 10 *S. pennellii*). Были в белковых последовательностях *CrtISO* и *CrtISO-L2* выявлены некоторые эволюционно более поздние замены, характерные только для красноплодных видов (*CrtISO*- Y8F, Q169H- *CrtISO-L2*) (рис. 3.4.1).

### 3.4.2. Структурный анализ гомологичных генов *CRTISO* (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*) у образцов томата

Анализ консервативных мотивов с использованием программы MEME 7.0.26 позволил выявить в исследуемых ортологах *CRTISO* пяти видов томата 24 достоверных мотивов (рис. 3.4.2). Среди них 13 мотивов были общими (мотивы 1-4 6-12, 19 и 22) для всех гомологов *CTRISO*, а остальные были специфичны для *CrtISO* (мотивы 5, 20, 21 и 24), *CrtISO-L1* (мотивы 14, 15, 16) и *CrtISO-L2* (мотивы 13,17). Мотивы 18 и 23 были общими для *CrtISO* и *CrtISO-L2*.

Анализ консервативных доменов (согласно ресурсу NCBI-CCD) показал, что аминокислотные последовательности всех трех ортологов CRTISO у всех анализируемых видов томата имеют общий NAD(P)H/NAD(P)(+)-связывающий (NADB) домен, что позволяет отнести их к суперсемейству NADB белков. Также у всех белков был выявлен аминоксидазный домен (Pfam:PF01593). Полученные результаты совпадают с ранее полученными данными по наличию этих двух функциональных доменов у белков каротин-cis-trans-изомераз (Jiang et al., 2019).

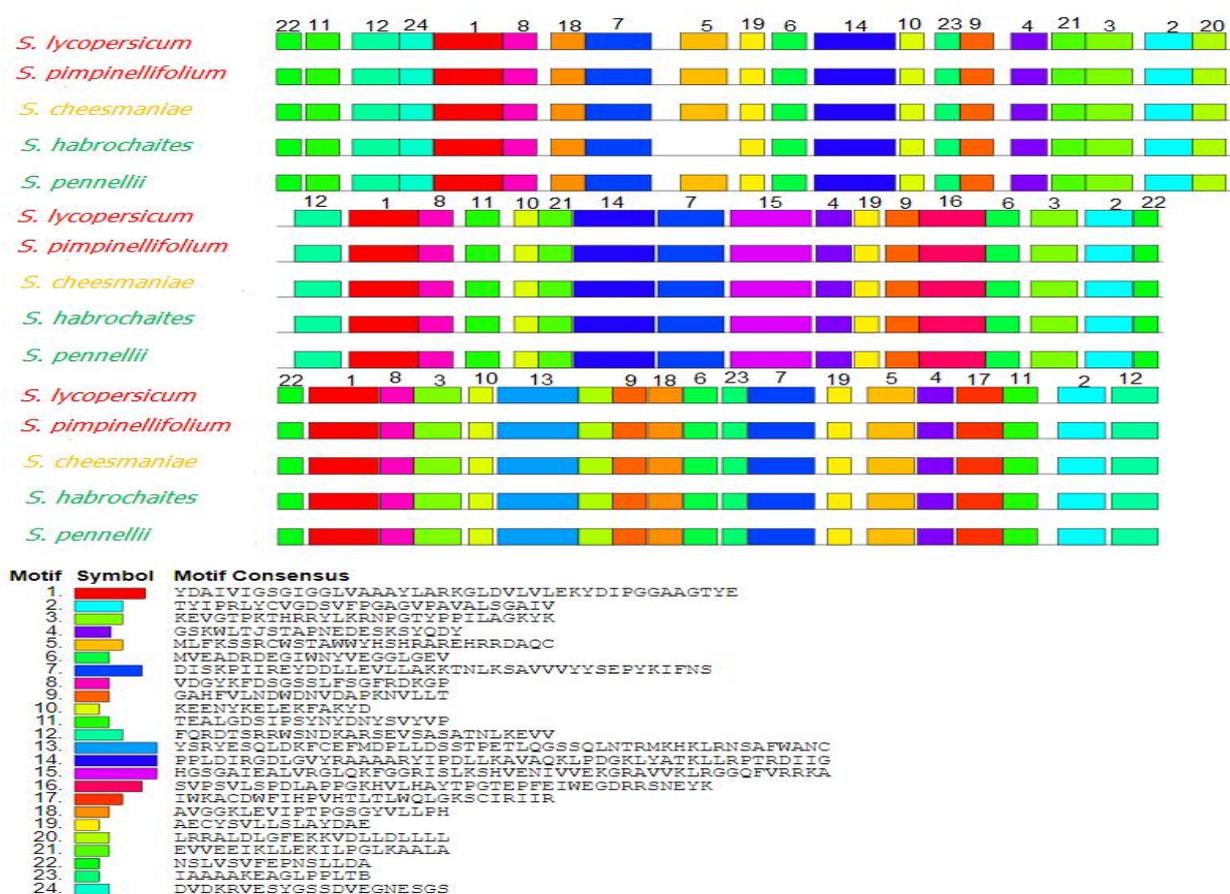


Рисунок 3.4.2 – Распределение консервативных мотивов гомологов CRTISO у пяти видов томата (MEME 7.0.26) Порядок мотивов соответствует их положению в белке.

### 3.4.3. Филогения видов томата на основе аминокислотных последовательностей гомологичных генов CRTISO (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*) у образцов томата

Был проведен филогенетический анализ полученных ортологов *CrtISO*, распределивший их по трем ген-специфичным кладам (рис 3.4.3). Как следует из рисунка, клада *CrtISO-L2* формирует базальную группу по отношению к сестринским кладам *CrtISO* и *CrtISO-L1*. Такое положение может свидетельствовать о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о большем сходстве белков *CrtISO* и *CrtISO-L1*.

Наличие всех трех гомологов у *A. thaliana* и *Brassica napus* (рис. 3.4.3) позволяет предположить, что их возникновение предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

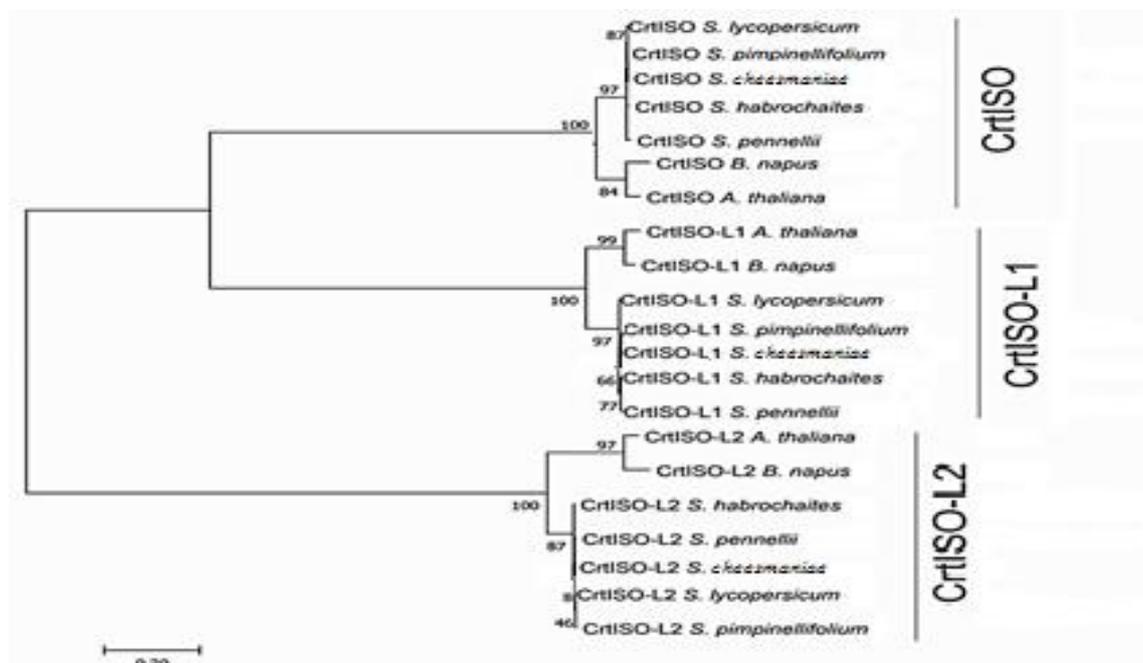


Рисунок 3.4.3 – Дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* *S. lycopersicum* (сорт. Heinz), *S. pimpinellifolium* (LA0480), *S. cheesmaniae* (LA0421), *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA2144), *A. thaliana* и *B. napus*. (метод ML; 1000 бутстреп-реплик).

#### 3.4.4. Экспрессия гомологичных генов *CRTISO* (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*) в различных органах и на различных стадиях созревания плода у образцов томата

В ходе эволюции растений пара логичные гены ряда ферментов биосинтеза каротиноидов подверглись субфункционализации: паралоги по-разному экспрессируются в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих тканях (Galpaz et al., 2006). Для того чтобы определить, какой из трех генов каротеноид-изомераз активен в плоде томата, был проведен предварительный *in silico* анализ экспрессии этих генов сорта Heinz 1706 (база Tom Express (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr>)) (рис. 3.4.4).

В результате было обнаружено, что ген *CRTISO* экспрессируется во всех анализируемых тканях и органах растения с максимумом в плоде, а также в листе и цветке. При этом в плоде наибольший уровень транскрипции *CRTISO* наблюдается на стадии смены окраски с зеленой на красную (BR) и при биологической спелости (RR) (рис. 3.4.4). Транскрипция другого гена *CRTISO-L1* наиболее активна в цветке томата, причем экспрессия значительно ниже, чем у гена *CRTISO*, а в плоде близка к нулевому значению.

мРНК третьего гена *CRTISO-L2* в анализируемых тканях томата в сравнении с другими генами каротин-*cis-trans*-изомераз незначительна (рис. 3.4.4).

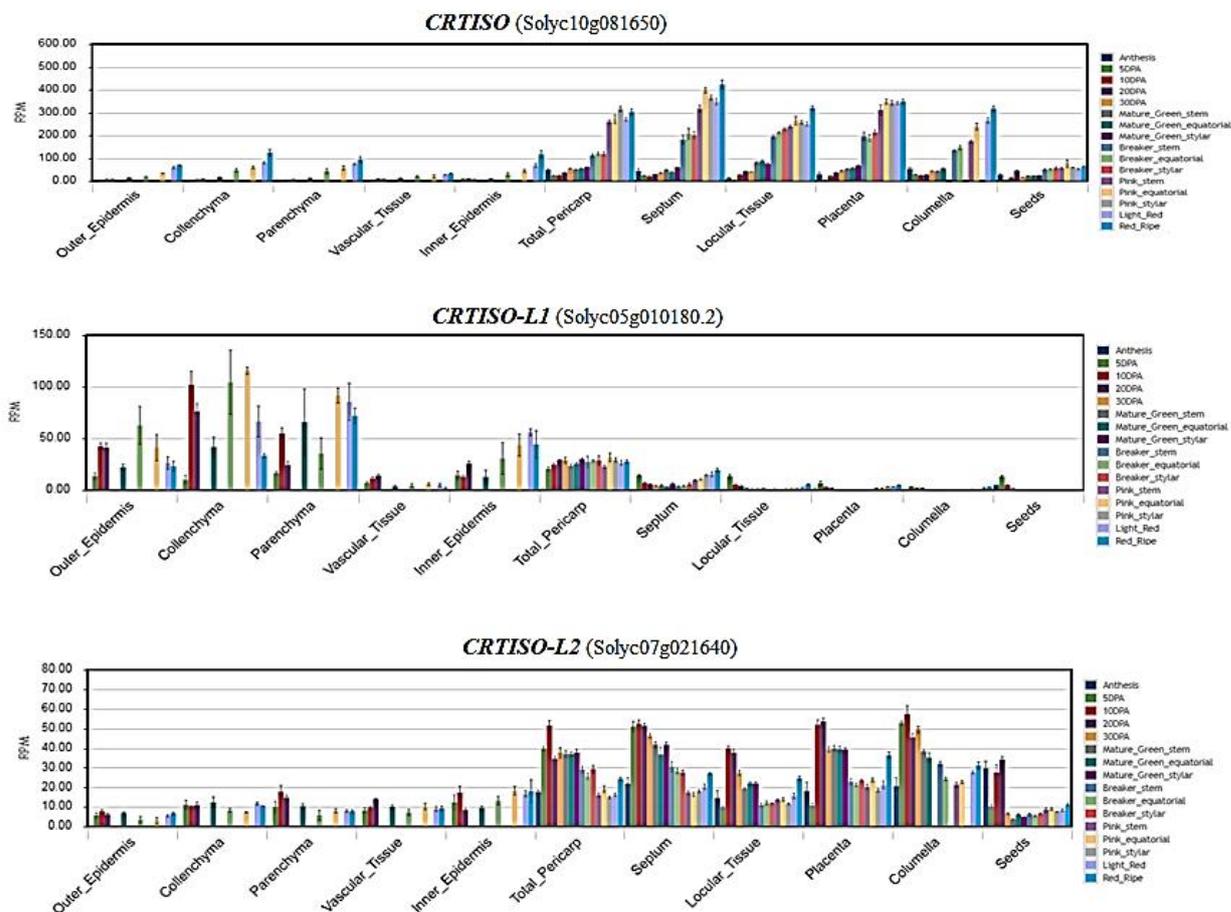


Рисунок 3.4.4 – Относительный уровень транскрипции генов *CRTISO* (Solyc10g081650), *CRTISO-L1* (Solyc05g010180.2) и *CRTISO-L2* (Solyc07g021640) в различных органах растений томата *S. lycopersicum*. (согласно <https://tea.solgenomics.net>).

Исходя из полученных *in silico* данных для анализа экспрессии генов каротин-*cis-trans*-изомераз у анализируемых пяти видов томата были выбраны следующие органы: лист, плод стадии MG, RR/RF для образцов всех видов и для образцов красноплодных видов *S. lycopersicum* (сорта Heinz, Корнеевский) и *S. pimpinellifolium* дополнительно стадия BR (рис.3.4.5). Проведенный экспрессионный анализ обнаружил транскрипты всех трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов пяти 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*, который наиболее активно транскрибировался у *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, соответственно) (рис. 3.4.5).

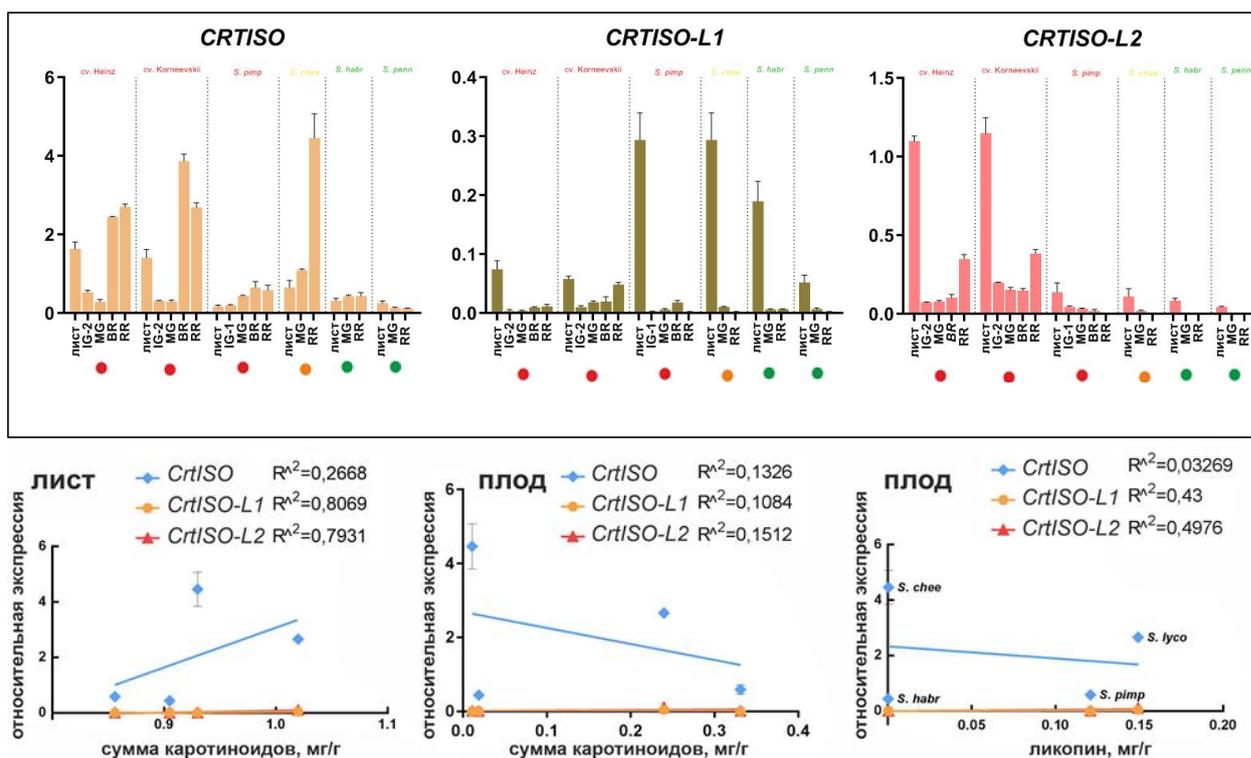


Рисунок 3.4.5 – Профиль экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листе и в плоде в динамике созревания и его корреляция с содержанием каротиноидов в листе и спелом плоде *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* и *S.pennellii* (окраска спелого плода соответствует цветному кругу под графиком).

Более высокий уровень транскриптов *CrtISO* по сравнению с *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* (рис. 3.4.5) согласуется с профилем экспрессии ортологичных генов у апельсина *C. sinensis* (Pinheiro et al., 2019), что подтверждает ключевую роль именно гена *CrtISO* в каротиногенезе как в листьях, так и в плодах. Значительно большее количество транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листьях по сравнению с плодами (рис. 3.4.5.) предполагает преимущественное участие этих генов в биосинтезе каротиноидов в фотосинтезирующей ткани. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* могут определять сдвиг биосинтеза каротиноидов в сторону полностью-транс- $\zeta$ -каротина и терпеноидов, являющихся промежуточными продуктами в биосинтезе различных жирowych соединений, и, таким образом, сохраняют раннюю функцию каротиноид-изомераз в синтезе каротиноидов для клеточных мембран.

Проведенная оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* не выявила такой взаимосвязи в спелом плоде у видов томата (рис. 3.4.5). В листьях были обнаружены положительные закономерности «сумма каротиноидов – уровень транскриптов *CrtISO-L1/CrtISO-L2*» (рис. 3.4.5.).

Для проверки предположения о корреляции между количеством ликопина или же суммы каротиноидов с активностью гена *CRTISO* был проведен анализ экспрессии *CRTISO* в спелых плодах 18 сортов томата, отличающихся содержанием каротиноидов и окраской. Наибольшим уровнем транскрипции характеризовался сорт Викинг, наименьшим – Л-Несозревающий (рис. 3.4.6.).

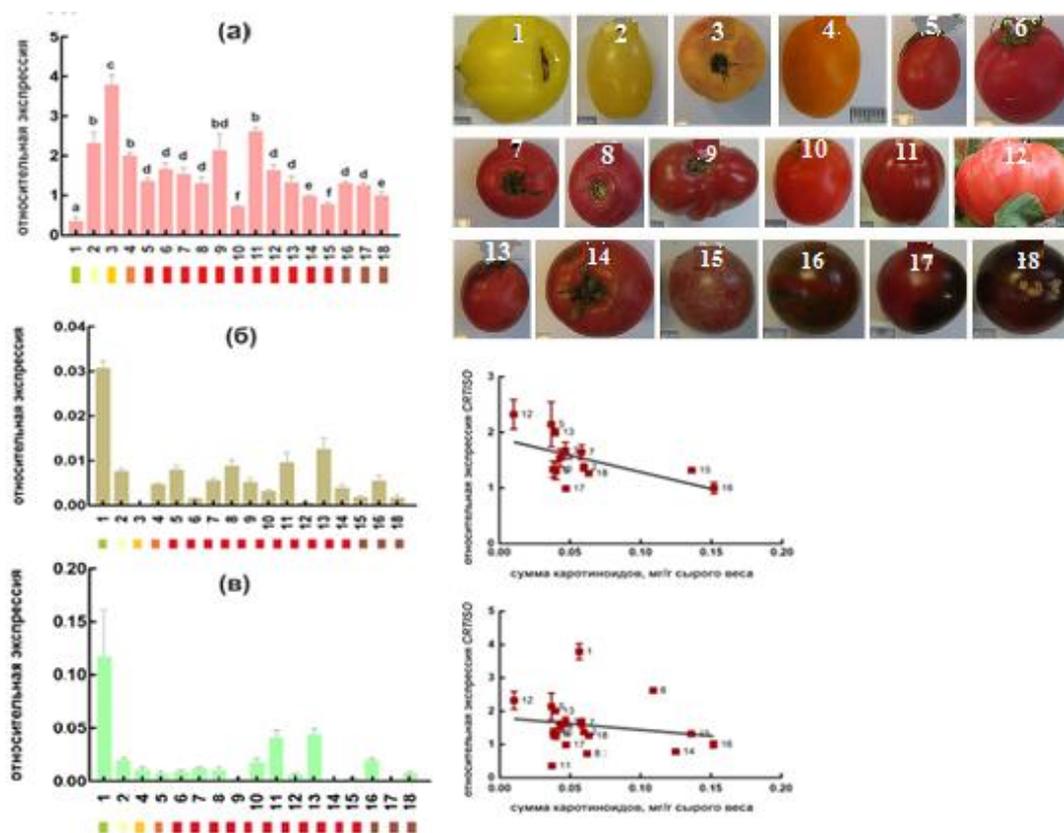


Рисунок 3.4.6 – Профиль экспрессии генов *CrtISO* (a), *CrtISO-L1* (б) и *CrtISO-L2* (в) и корреляция *CrtISO* с содержанием каротиноидов в спелом плоде. Окраска зрелого плода обозначена цветом. Сорта и линии томата: Л-Несозревающий (1); Л-Черри лимонно-желтые (2); Викинг (3); Л-Золотой лотос (4); Грот (5); Благодатный (6); Лотос (7); Подарок к юбилею (8); Малиновый силач (9); Гаяна (10); Гармошка (11); сорт Русский размер (12); Дубок (13); Л-411 (14); Л-Черри розовые (15); Л-Черри арбуз (16); Л-176 (17); Черри коричнево-фиолетовые (18).

У большинства красноплодных сортов экспрессия гена *CRTISO* статистически достоверно не различалась, за исключением сорта Гаяна и Л-Черри розовые (наименьший у красноплодных образцов уровень транскрипции), а также сортов Малиновый силач и Гармошка (наибольший у красноплодных образцов уровень транскрипции) (рис. 3.4.6).

### 3.4.5. Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии гомологичных генов *CRTISO* (*CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*) у образцов томата

Проведенная оценка не выявила корреляции зависимости содержания суммы каротиноидов в зрелом плоде сортов, различающихся содержанием каротиноидов и окраской плода, от уровня экспрессии гена *CRTISO*. Так, коэффициент детерминации  $R^2$  между содержанием суммы каротиноидов и уровнем экспрессии *CRTISO* для всех анализируемых образцов составил 0.03248 (рис. 3.4.6.), что ниже критерия наличия корреляции ( $R^2 \geq 0.7$ ).

### 3.3.6. Идентификация мутаций *tangerine 3183* и *tangerine mic* у желтоплодных образцов томата

Ранее были найдены две мутации в гене *CRTISO*, названные *tangerine 3183* и *tangerine mic*, приводящие к появлению плодов томата с желто-оранжевой окраской. Было показано, что плоды с мутацией *tangerine* накапливают зета-каротин и *cis*-проликопин вместо *all-trans*-ликопина, который отвечает за красный цвет плодов, и именно зета-каротин приводит к окраске плодов в насыщенный оранжевый (мандариновый) цвет (Isaacson et al., 2002). Молекулярный анализ показал, что у двух мутантов *tangerine* потеря функции связана либо с делецией 282 п.н. (24 п.н. в экзоне I и 258 п.н. в интроне I) в кодирующей последовательности гена с образованием преждевременного стоп-кодона (мутация *tangerine mic*), либо с нарушением экспрессии *CRTISO* за счёт делеции 348 п.н. в промоторе (мутация *tangerine 3183*) В результате оранжевая окраска плода объясняется накоплением зета-каротина и проликопина (Isaacson et al., 2002).

В отдельную скорее практическую задачу, связанную с анализом гена *CRTISO* было выделено определение у желтоплодных сортов томата наличия мутаций *tangerine 3183* и *tangerine mic*. Для анализа использовались праймеры *CrtISO tangerine 3183 F*, *CrtISO tangerine 3183 R*, *CrtISO tangerine mic F*, *CrtISO tangerine mic R*.

Для определения мутаций *tangerine 3183* и *tangerine mic* были отобраны образцы 19 желто- и оранжевоплодных сортов и линий (Т-Т15300, Долгоносик, Дынюшка-1с, Алтайский оранжевый, Хурма, Оранжевое чудо, Осенняя рапсодия, Оранжевый гигант, Черри желто-оранжевые, Дынюшка-2с, Де-Барао оранжевый, Органза, Черри овално-оранжевые, Черри оранжевые, Золотой лотос, Yellow Peach, Черри лимонно-желтые, Викинг, Жидкова) из коллекции ФНЦО РАН. Амплификация фрагментов с разработанными праймерами на обе мутации и последующий анализ полученных фрагментов показали, что сорта Т-Т15300, Алтайский оранжевый, Хурма, Оранжевый

гигант, Черри желто-оранжевые, Де-Барао оранжевый, Органза, Черри оранжевые и Золотой лотос, характеризовались наличием мутации *tangerine 3183* (фрагмент короче, за счёт делеции 348 п.н. в промоторе). Сорта Дынюшка2-с, YellowPeach, Черри лимонно-желтые Викинг и Жидкова являлись гетерозиготами по мутации *tangerine 3183*. У остальных желто- и оранжевоплодных сортов (Долгоносик, Дынюшка-1с, Оранжевое чудо, Осенняя рапсодия, Черри овально-оранжевые) мутация *tangerine 3183* выявлена не была (рис.3.4.7).

Мутации *tangerine cis* в анализируемой выборке найдено не было.

Разработанные маркеры на мутации *tangerine* в данный момент используются в программах ФНЦО РАН для селекции оранжевоплодных сортов томата.

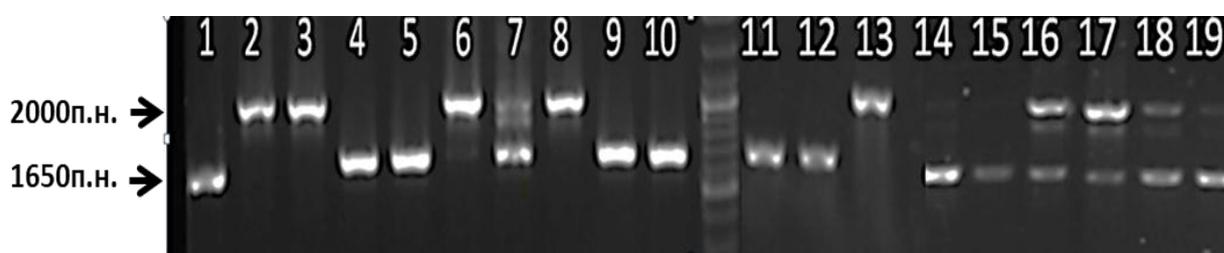


Рисунок 3.4.7 – Определение мутации *tangerine 3183* у желто- и оранжевоплодных сортов томата *S. lycopersicum*. Сорта: Т-Т15300 (1), Долгоносик (2), Дынюшка 1с-эп (3), Алтайский оранжевый (4), Хурма (5), Оранжевое чудо (6), Дынюшка 2с-эп (7), Осенняя рапсодия (8), Оранжевый гигант (9), Черри желто оранжевые (10), Де-Барао оранжевый (11), Органза (12), Черри овально оранжевые (13), Черри оранжевые (14), Золотой лотос (15), Yellow Peach (16), Черри лимонно желтые (17), Викинг (18), Жидкова (19). Фрагмент 2000 п.н. соответствует дикому типу; фрагмент 1650 – мутации *tangerine 3183*.

Таким образом, были определены и охарактеризованы три гена каротин-*cis-trans*-изомераз у анализируемых красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видов томата. Проведенный экспрессионный анализ показал, что ген *CrtISO* играет определяющую роль в биосинтезе каротиноидов как в плодах, так и в листьях. Экспрессия *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листьях предполагает преимущественное участие этих генов в биосинтезе каротиноидов в фотосинтезирующей ткани. Был выявлен крайне высокий уровень экспрессии генов-гомологов *CrtISO* в спелых плодах образца *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, соответственно). Проведенный филогенетический анализ полученных ортологов каротин-*cis-trans*-изомераз свидетельствует о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о большем сходстве белков *CrtISO* и *CrtISO-L1* и позволяет предположить, что возникновение этих трех генов предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

### 3.5. Идентификация и структурно-филогенетическая характеристика генов-гомологов 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназы *NCED* в сортах и дикорастущих видах томата

Апокаротиноиды, включающие крайне важные для роста и развития растений гормоны (абсцизовая кислота, стриголактоны), и летучие соединения, являются производными каротиноидов. Их синтез осуществляется за счет окислительного расщепления каротиноидов, опосредованного каротиноид-расщепляющими диоксигеназами (CCD) и 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназами (NCED) (López-Ráez et al., 2010; Смоликова, Медведев 2015).

Абсцизовая кислота, являясь одним из основных растительных гормонов, играет определяющую роль в созревании и старении плодов (Kohlen et al., 2012; Kou et al., 2021). Гормон АБК образуется в результате окислительного расщепления эпоксикаротиноидов (неоксантин и виолаксантин) (Zhang et al., 2009; Смоликова, Медведев 2015). Ключевыми ферментами пути биосинтеза АБК являются 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (NCED), которые охарактеризованы у различных видов растений, в том числе у видов, образующих сочные ягоды (Tan et al. 2003; Zhang et al., 2009; Смоликова, Медведев 2015; Li et al., 2019; Wang et al., 2021). Показано, что именно индукция синтеза АБК под воздействием активированных NCED является критической важной стадией, необходимой для инициации созревания (Zhang et al., 2009). При этом деятельность генов *NCED*, скорее всего, не оказывает непосредственного влияния на уровень каротиноидов в растениях (Zhang et al., 2009; Li et al., 2019; Wang et al., 2021). Интересно отметить, что белки NCED, в отличие от большинства ферментов каротиногенеза, локализованы в цитозоле (Frusciante et al., 2014). Показано, что белки NCED определяют устойчивость томата к солевому, холодовому стрессу и засухе (Yang et al., 2014; Muñoz-Espinoza et al., 2015; Kai et al., 2019; Martínez-Andújar et al., 2020; Ding et al., 2023).

Семейство генов *NCED* томата включает три гена, при этом считается, что только гены *NCED1*, *NCED2* и, в меньшей степени, *NCED6* вовлечены в синтез АБК и биосинтез каротиноидов путем сокращения синтеза нижестоящих ксантофиллов (Taylor et al., 2005). У томата гены *NCED* охарактеризованы только у культивируемого вида *S. lycopersicum*. При этом детально охарактеризовано участие преимущественно одного из генов семейства *NCED* – *SINCE1* в процессе развития плода. Было показано, что экспрессия гена *SINCE1* инициирует синтез АБК в начале созревания плода, а также играет решающую роль в регуляции развития пестика и завязывания плода (Zhang et al., 2009; Kai et al., 2019). Конститутивная сверхэкспрессия гена *SINCE1* приводит к значительному

росту концентрации АБК в тканях, увеличению количества партенокарпических плодов (Kai et al., 2019; Martínez-Andújar et al., 2020). Более того, различия в уровне экспрессии *SINCE1* и, соответственно, в содержании АБК, определяют степень солеустойчивости генотипов томата (Yang et al., 2014). В то же время инактивация гена *SINCE1* приводит к снижению накопления АБК и росту содержания вышестоящих соединений каротиноидного пути, в основном ликопина и  $\beta$ -каротина, и как следствие, к более насыщенной красной окраске плодов томата (Sun et al., 2012).

Что касается другого представителя семейства – *NCED2*, то в литературных данных описаны только некоторые особенности его экспрессии у *S. lycopersicum* и связь с жасмонат-опосредованной регуляцией синтеза АБК (Ding et al., 2023).

Таким образом, анализ последовательности и экспрессии генов *NCED* у томата проводился только для *S. lycopersicum*, а для остальных видов этих данных не было, равно как и данных о регуляторных последовательностях этих генов, в том числе и для культивируемого вида.

### 3.5.1 Идентификация, структурный анализ и характеристика вариабельности гомологичных *NCED1* и *NCED2* генов у образцов видов *Solanum* секции *Lycopersicon*

Для идентификации и проведения сравнительного молекулярно-генетического анализа кодирующих и регуляторных последовательностей генов-гомологов *NCED1* и *NCED2* нами были выбраны пять видов томата: красноплодные *S. lycopersicum* (сорт Heinz и Корнеевский), *S. pimpinellifolium* (LA0480), желтоплодный *S. cheesmaniae* (LA0421) и зеленоплодные *S. habrochaites* (LA2144), *S. pennellii* (LA0716).

Также, как и в случае с другими генами первым этапом работы стала разработка праймеров для идентификации (амплификации, секвенирования) и экспрессионного анализа на основе анализа полногеномных последовательностей томата *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (GCA\_000188115.4), *S. pennellii* (GCA\_001406875.2), представленных в базе данных NCBI. Праймеры были разработаны таким образом, чтобы помимо кодирующей последовательности генов включать также и ~1.5-1.7 т.п.н. регуляторной области. Разработанные праймеры для амплификации, внутренние праймеры для секвенирования и анализа экспрессии представлены в таблице 2.2.1.

С использованием праймеров *NCED1promF* и *NCED1endR*, *NCED2promF* и *NCED2endR* были получены амплификаты размером ~3,5 т.п.н., что совпадало с ожидаемым размером гена. Амплифицированные фрагменты *NCED* у пяти видов томата были клонированы в плазмиду pGEM-T и не менее двух клонов каждого гена-гомолога секвенированы. Характеристика полученных последовательностей приведена в табл. 3.5.1.

В общей сложности для всех пяти видов томата были получены полногеномные последовательности гомологичных генов *NCED1* и *NCED2*, включая 5'-UTR и промоторные области. Размеры идентифицированных генов-гомологов *NCED1* видов томата варьировали от 3380 до 3418 п.н. из-за изменчивости длины промотора (~1400-1500 т.п.н) и 5'-UTR (~ 80 п.н.). Размеры идентифицированных генов-гомологов *NCED2* варьировали от 3124 до 3133 п.н. из-за изменчивости длины промотора (~1000-1200 т.п.н) и 5'-UTR (~ 85 п.н.). Тогда как у всех взятых в анализ образцов кодирующие последовательности (кДНК) были одинакового размера (1818 и 1746 п.н.) для *NCED1* и *NCED2*, соответственно (табл. 3.5.1).

Таблица 3.5.1. Характеристика последовательности генов - гомологов и их продуктов *NCED1* и *NCED2* у анализируемых сортов и видов томата.

Вид	Сорт/ номер кат.	Цвет спелого плода	Длина гена, п.о	Длина кодируще й части, п.о	Длина 5'- UTR и промотора, п.о	Длина белка, а.о	Изоэлек трическ ая точка белка, IP	Молек улярна я масса, кДа
<i>NCED1</i>								
<i>S. lycopersicum</i>	cv. Heinz	Красный	1,818	1,818	78/1,517	606	6.33	66.5
<i>S. pimpinellifolium</i>	VIR1018	Красный	1,818	1,818	82/1,517	606	7.33	66.6
<i>S. cheesmaniae</i>	LA0421	Желтый	1,818	1,818	72/1,526	606	6.18	66.6
<i>S. habrochaites</i>	LA1777	Зеленый	1,818	1,818	83/1,521	606	6.57	66.8
<i>S. pennellii</i>	LA0716	Зеленый	1,818	1,818	85/1,522	606	6.60	66.4
<i>NCED2</i>								
<i>S. lycopersicum</i>	cv. Heinz	Красный	1,746	1,746	85/1,035	582	6.00	64.5
<i>S. pimpinellifolium</i>	VIR1018	Красный	1,746	1,746	84/1,035	582	5.79	64.5
<i>S. cheesmaniae</i>	LA0421	Желтый/о ранжевый	1,746	1,746	83/1,148	582	6.00	64.5
<i>S. habrochaites</i>	LA1777	Зеленый	1,746	1,746	85/1,177	582	5.92	64.4
<i>S. pennellii</i>	LA0716	Зеленый	1,746	1,746	84/1,174	582	5.90	64.4

По сравнению с последовательностями *NCED1* и *NCED2* сорта Heinz 1706 (NM\_001375893), для *NCED1* у анализируемых образцов видов томата характерен более высокий уровень полиморфизма кодирующих и промоторных последовательностей (182 SNP в кодирующих и 328 SNP в промоторных последовательностях).

Полногеномные гомологичные последовательности *NCED2* анализируемых видов характеризовались гораздо более низким уровнем полиморфизма кодирующих и

промоторных последовательностей (42 SNP в кодирующих последовательностях и 143 SNP в промоторных).

Анализ уровня полиморфизма зеленоплодных видов показал, что они были наиболее полиморфными. При этом наибольшее число SNPs у зеленоплодных видов было обнаружено в промоторе и 5-UTR.

Полученные нуклеотидные последовательности генов-гомологов *NCED1* и *NCED2* пяти видов томата были транслированы. Сравнительный анализ гомологичных *NCED1* и *NCED2* белков показал, что 90 и 22 SNP привели к аминокислотным заменам, из которых, согласно программе PROVEAN, 30 и 8 замен были радикальными для *NCED1* и *NCED2* соответственно. Общий уровень полиморфизма аминокислотных последовательностей составил 15 и 4 % для *NCED1* и *NCED2* (рис. 3.5.1).

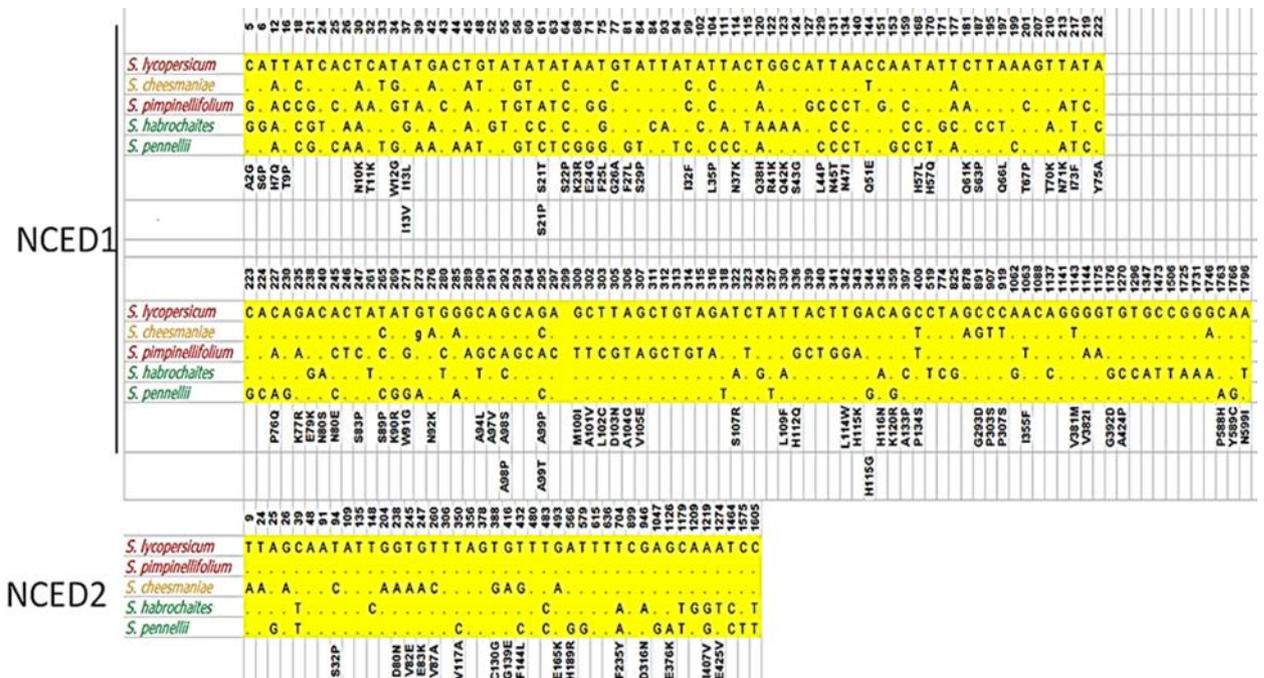


Рисунок 3.5.1 – Уровень полиморфизма идентифицированных гомологов *NCED1* и *NCED2* генов у пяти видов томата. Цифры обозначают положение SNP в кодирующих последовательностях *NCED1* и *NCED2* генов по сравнению с последовательностью *S. lycopersicum*; аминокислотные замены в белках приведены ниже.

Проведенный структурно-филогенетический анализ гомологов *NCED* у видов томата показал, что оба гена *NCED1* и *NCED2* являются безинтронными и идентичны друг другу на 74% (на белковом уровне – 71%). Белки *NCED1* и *NCED2* содержали согласно ресурсу NCBI-CCD консервативный домен, характерный для 9-cis-ε-оксикароотиеноид диоксигеназы *NCED* (PLN02258). На дендрограмме последовательности каждого из гомологов образуют отдельные кластеры (рис. 3.5.2). Анализ консервативных доменов в программе MEME показал, что аминокислотные последовательности *NCED1* и *NCED2* у

всех анализируемых видов томата имеют сходное строение и порядок доменов и мотивов. Всего было у белков идентифицировано 24 консервативных мотива. Из них 15 сохраняются в NCED1 и NCED2, что указывает на то, что эти мотивы обеспечивают выполнение общей функции.

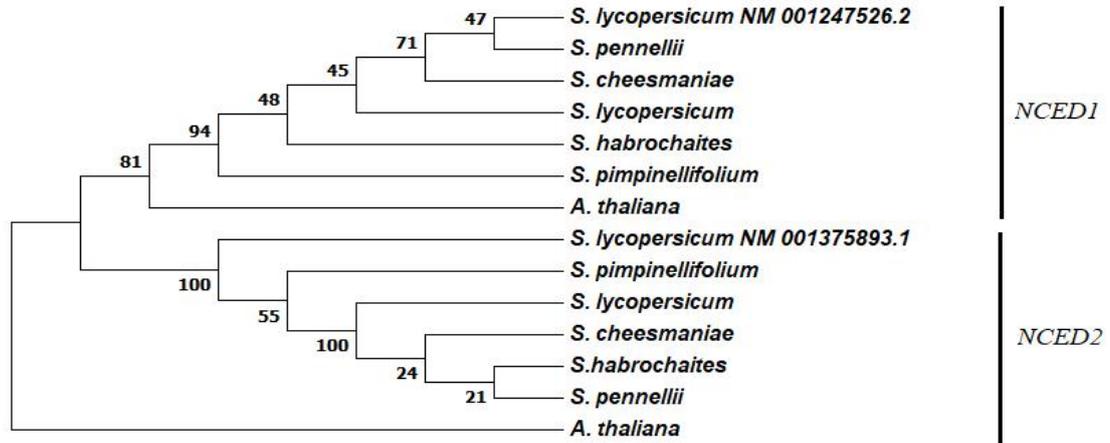


Рисунок 3.5.2 – Дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей гомологов NCED *S. lycopersicum* (SINCED), *S. pimpinellifolium* (LA0480), *S. cheesmaniae* (LA0421), *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA2144), *A. thaliana* в программе MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood; 1000 бутстреп-реплик).

Белки различаются по строению N-концевой последовательности. У NCED1 N-концевой участок представлен четырьмя мотивами (15, 10, 11 и 21), тогда как у NCED2 он совершенно иной и представлен другими мотивами (19, 20, 10 и 16) (рис.3.5.3).

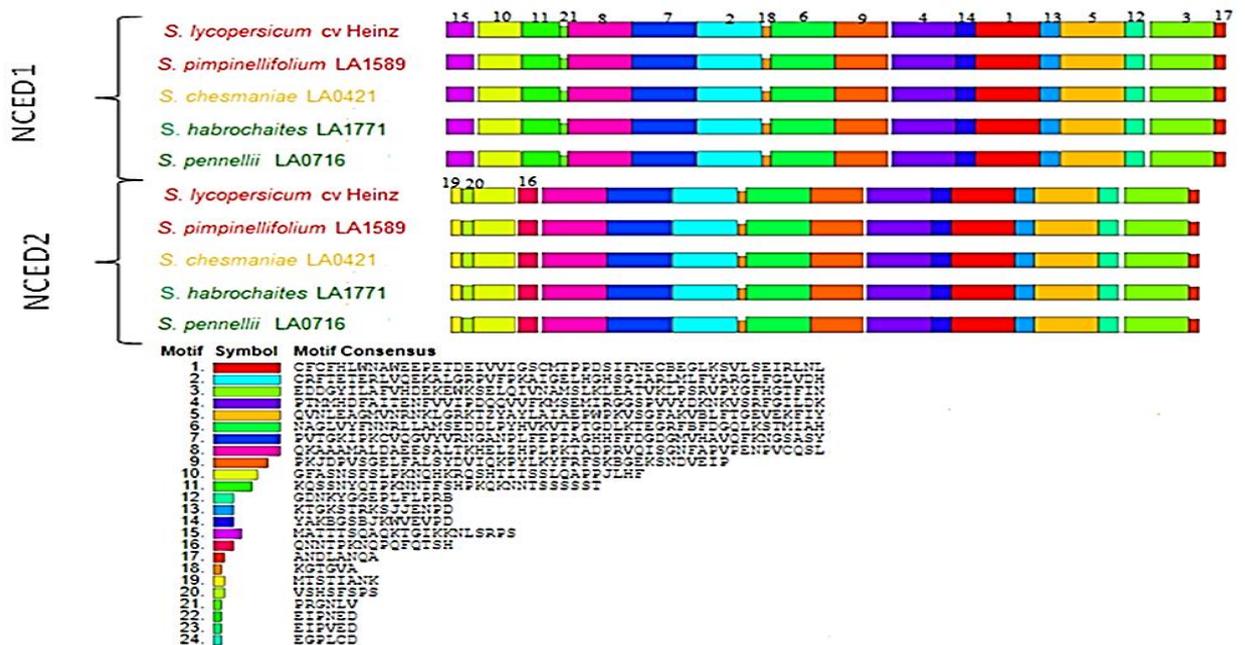


Рисунок 3.5.3 – Распределение консервативных мотивов в последовательностях гомологов NCED1 и NCED2 у пяти видов томата (MEME 7.0.26).

### 3.5.2. Экспрессия *NCED1* и *NCED2* в различных органах и на различных стадиях созревания плода у видов томата секции *Lycopersicon*

Так как данные по транскрипции генов *NCED* крайне ограничены, то аналогично генам *CRTISO*, для проведения более детального экспрессионного анализа был вначале проведен *in silico* анализ экспрессии генов *NCED1* и *NCED2* использованы база данных Tom Express (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/login>) для сорта Heinz 1706 *S. lycopersicum*.

Показано, что профили экспрессии обоих генов сходны между собой, при этом их транскрипты присутствуют во всех тканях и органах (корни, листья, меристемы, цветки, плоды) (рис. 3.5.4).

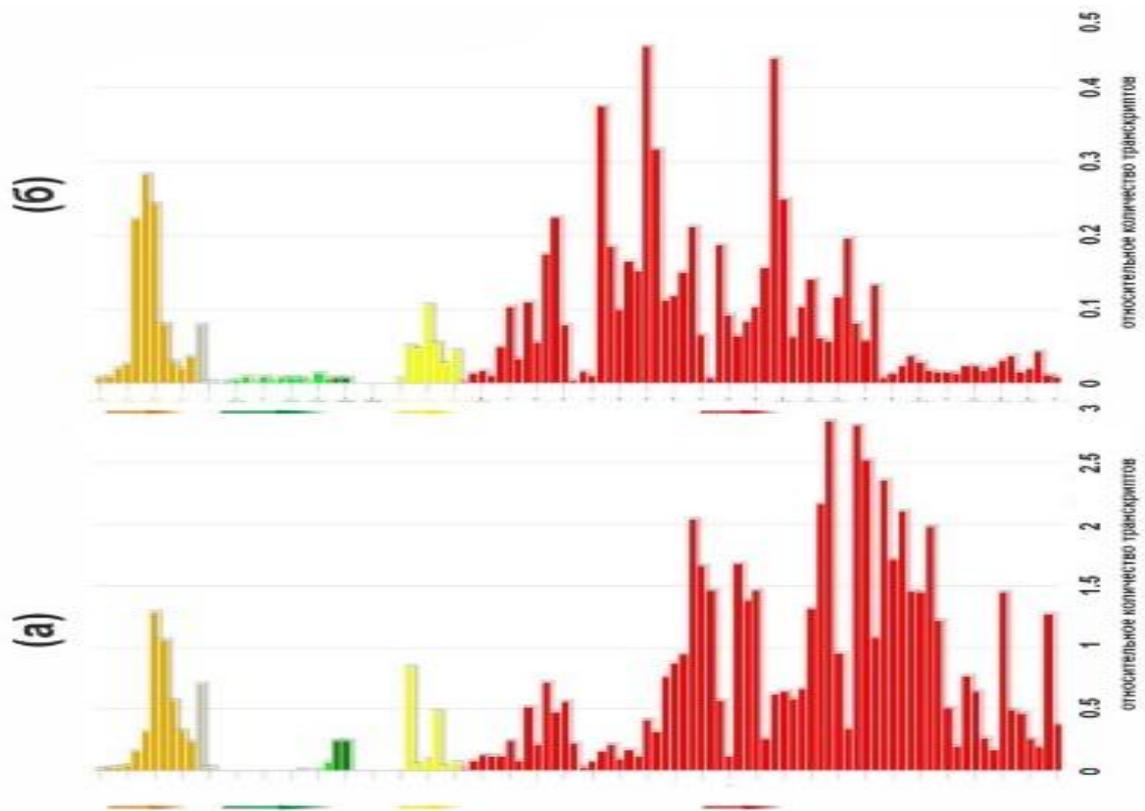


Рисунок 3.5.4 – Относительный уровень транскриптов генов *SINCED1* (Gene ID: 544163) (а) и *SINCED2* (Gene ID: 100316877) (б) в различных органах образцов томата *S. lycopersicum*. Направление стрелки (слева от каждого графика) соответствует поступательному развитию соответствующего органа. Экспрессия генов в разных органах обозначена цветом: корень – серым, лист – зеленым, меристема побега – салатovým, цветок – желтым, плод – красным, семена – коричневым.

Однако уровень транскриптов *SINCED1* значительно (в ~4–6 раз) выше, чем уровень транскриптов *SINCED2*. При этом наибольшая экспрессия *SINCED1* приходится на стадии созревания плода MG, BR и FR (рис. 3.5.4а), а *SINCED2* – на стадию IG (рис. 3.5.4б). Профиль экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2*, определенный *in silico* (рис.

3.5.4), указывает на функционирование обоих генов и в вегетативных (корень, лист, меристема), и в репродуктивных (цветок, плод, семена) тканях. Это косвенно подтверждает ранее высказанное предположение об участии обоих генов в развитии семян, а также говорит о совместном участии генов в регуляции биосинтеза АБК во всем растении томата (Zhang et al., 2009; Kai et al., 2019). Существенное превышение уровня транскриптов *SINCE1* по сравнению с *SINCE2* (рис. 3.5.4) может свидетельствовать о ключевой роли *SINCE1* и вспомогательной функции *SINCE2* в окислительном расщеплении каротиноидов до АБК. Это согласуется с данными, полученными ранее для *Prunus persica*, где было показано, что в плодах персика биосинтез АБК находится под совместным контролем двух изоферментов, PpNCED1 и PpNCED5, гены которых имеют схожие профили транскрипции, причем аналогично генам *SINCE2* и *SINCE1*, PpNCED5 транскрибируется ниже, чем PpNCED1 (Wang et al., 2021).

### 3.5.3. Анализ экспрессии *NCED1* и *NCED2* у красно-, желто- и зеленоплодных видов томата

Был проведен анализ транскрипции обоих генов *NCED* в листе и в плодах на трех стадиях созревания (IG, MG, BR, RR- у красноплодного вида, IG, MG, RR – у желтоплодного и зеленоплодных видов). Экспрессия гена *SINCE1* у двух красноплодных сортов (Heinz и Корнеевский) повышалась в процессе созревания плодов и в целом у красноплодного сорта Heinz была несколько выше, чем у сорта Корнеевский. При этом экспрессия гена *SINCE1* резко падала на стадии RR у сорта Heinz в отличие от сорта Корнеевский (рис. 3.5.5).

Экспрессия гена *NCED1* у красноплодных образцов вида была несколько выше, чем у желтоплодного вида *S. cheesmaniae*, особенно на стадиях BR и RR. Также экспрессия гена *NCED1* у образцов зеленоплодных видов была ниже в сравнении с красноплодными сортами. В случае дикорастущих видов экспрессия гена *NCED1* у *S. habrochaites* была немного выше, чем у *S. cheesmaniae*, тогда как у *S. pennellii* транскрипция была очень низкой. Экспрессия в листьях у всех проанализированных образцов была схожей и относительно невысокой.

Экспрессия гомолога *NCED2* у всех образцов в целом была ниже, чем у *NCED1*. Показано, что наиболее высокий уровень транскриптов *NCED2* обнаружен в плодах стадии IG (Корнеевский) и MG (Heinz, *S. cheesmaniae*) (рис. 3.5.5).

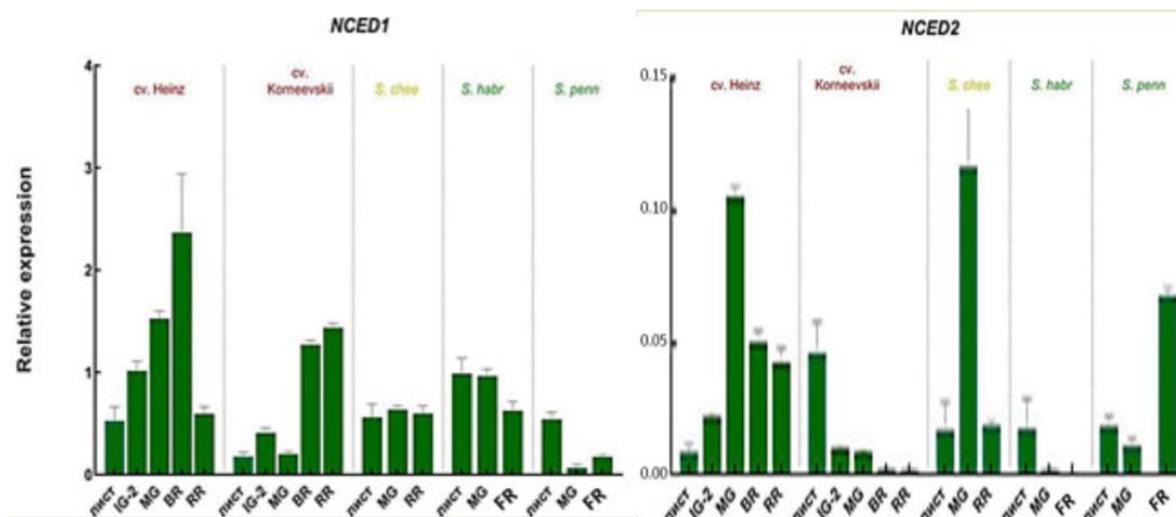


Рисунок 3.5.5 – Сравнение экспрессии генов-гомологов *NCED1* и *NCED2* в листьях и плодах (стадии IG, MG, BR и RR/FR) у *S. lycopersicum* (сорт Heinz), *S. pimpinellifolium* (LA0480), *S. cheesmaniae* (LA0421), *S. habrochaites* (LA2144), *S. pennellii* (LA0716).

Проведенный анализ экспрессии генов *SINCE1* и *SINCE2* у исследуемых сортов томата подтвердил *in silico* данные, касающиеся разницы в уровне транскриптов (рис. 3.5.4, 3.5.5). Более высокий уровень транскриптов *NCED1* по сравнению с *NCED2* возможно объясняется, тем, что у видов *NCED1* вносит больший вклад в биосинтез АБК, тогда как *NCED2* либо не принимает участия в биосинтезе АБК (Ntatsi et al., 2014), либо активизируется под действием внешних факторов, например, холодового стресса (Ding et al., 2023).

Обнаруженные различия в динамике экспрессии генов *NCED1* и *NCED2* у видов томата (рис. 3.5.5) также указывают на возможное разделение функций NCED между генами. Это подтверждается результатами РВ-ПЦР, согласно которым пики активности *NCED1* и *NCED2* приходятся на разные стадии – смены окраски (BR) и незрелого зеленого плода (IG/MG), соответственно (рис. 3.5.5).

#### 3.5.4. Выявление возможных корреляций содержания каротиноидов в плодах во время созревания и уровней экспрессии *NCED1* и *NCED2*

Проведена оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *NCED1* и *NCED2*. Согласно полученным данным, корреляция с количеством суммы каротиноидов и ликопина отсутствует для всех видов. Для красноплодных сортов Heinz и Корнеевский обнаружена статистически значимая обратная взаимосвязь между уровнем транскриптов *SINCE1* и содержанием  $\beta$ -каротина по мере созревания плодов (для сорта Heinz: IG-1 - 0.018 мкг/г, MG - 0.013 мкг/г, BR - 0.012 мкг/г и RR – 0.020 мкг/г; для сорта Корнеевский: для сорта Heinz: IG-1 - 0.018 мкг/г, MG - 0.013 мкг/г, BR - 0.012 мкг/г и RR – 0.020 мкг/г; для сорта Корнеевский: IG-1 - 0.015 мкг/г, MG - 0.008 мкг/г, BR - 0.024 мкг/г и

RR – 0.020 мкг/г); в случае *SINCED2* корреляция менее выражена, однако тоже статистически возможна (коэффициенты детерминации  $R^2 = 0.4028$  и  $0.6186$  для сорта Heinz и Корнеевский соответственно) (рис. 3.5.6).

Для уточнения количества непосредственных предшественников АБК проведен дополнительный HPLC- анализ содержания виолаксантина и неоксантина в плодах на четырех стадиях развития красноплодного сорта Heinz и желтоплодного Копилка желтая. Виолаксантин обнаружен в достаточных количествах только на стадии формирования плодов IG-1 (1.6 мкг/100 г у красноплодного сорта Heinz и 6 мкг/100 г у желтоплодного сорта – Копилка желтая); на стадии IG-1 и MG содержание неоксантина было высоко, что у красноплодного сорта Heinz, что и у желтоплодного сорта – Копилка желтая и составляло 23.3 мкг/100 г и 16 мкг/100 г, тогда как на стадии BR неоксантин присутствовал в следовых количествах (до 2-4 мкг/100 г в обоих сортах), а на стадии RR пигмент у обоих сортов отсутствовал.

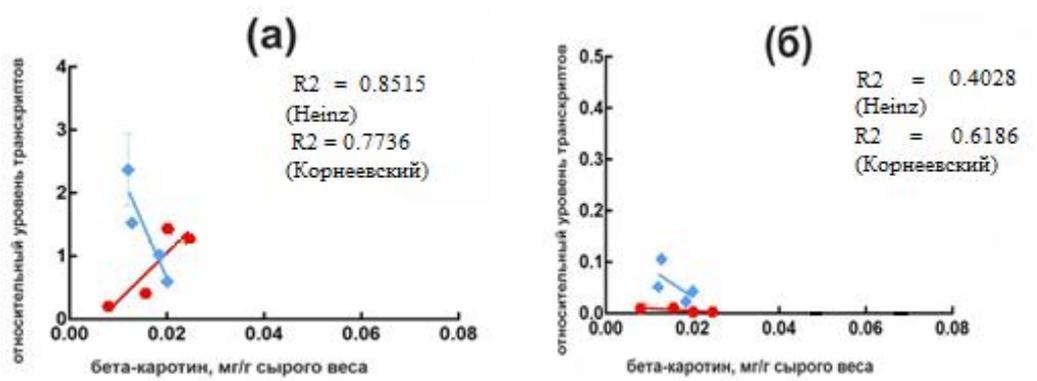


Рисунок 3.5.6 – Оценка корреляции между содержанием  $\beta$ -каротина и относительным уровнем транскриптов генов *SINCED1* (а) и *SINCED2* (б). Линейная регрессия выполнена в разном цвете, в зависимости от сорта: синим – Heinz; красным – Корнеевский. В случае гена *SINCED1*:  $R^2 = 0.8515$  (Heinz),  $R^2 = 0.7736$  (Корнеевский). В случае гена *SINCED2* коэффициенты следующие:  $R^2 = 0.4028$  (Heinz),  $R^2 = 0.6186$  (Корнеевский).

Данные HPLC анализа показали, что спелые плоды сортов Heinz и Копилка желтая не содержат непосредственных предшественников АБК – виолаксантина и неоксантина. При этом их высокое содержание на начальных стадиях развития/созревания плода согласуется со снижением уровня транскриптов *SINCED1* и *SINCED2*, а также с ролью АБК как индуктора созревания, которая на более поздних стадиях переходит к этилену.

Таким образом, полученные данные предполагают совместное участие генов *NCED1* и *NCED2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. При этом ключевая роль принадлежит гену *NCED1*, пик активности которого приходится на стадию смены окраски плода. 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.

3.5.4. Анализ регуляторных последовательностей (промоторной области и 5' UTR последовательности) NCED1 и NCED2 у красноплодного и зеленоплодных видов томата

Помимо кодирующих последовательностей, аналогично другим генам каротиногеназа были проанализированы последовательности промоторной области и 5' UTR NCED1 и NCED2 образцов двух видов красноплодного S. lycopersicum сорт Heinz и зеленоплодного S. pennellii LA0716 на наличие цис-регуляторных элементов в промоторе (1,1–1,5 т.п.н.) и области 5' UTR (70–80 п.н.). Длину регуляторной области выбирали исходя из размера предсказанного промотора NCED генов A. thaliana (1,2 т.п.н.).

В анализируемой регуляторной области генов NCED1 и NCED2 было обнаружено 33 цис-регуляторных элемента, в том числе 9 светочувствительных, 15 гормон-чувствительных и 9 стресс-чувствительных элементов. Остальные элементы представляли собой сайты связывания факторов транскрипции (WRKY, MYB, ARR1, DOF, RAV1, bZIP, MADS и др.) (рис.3.5.7).

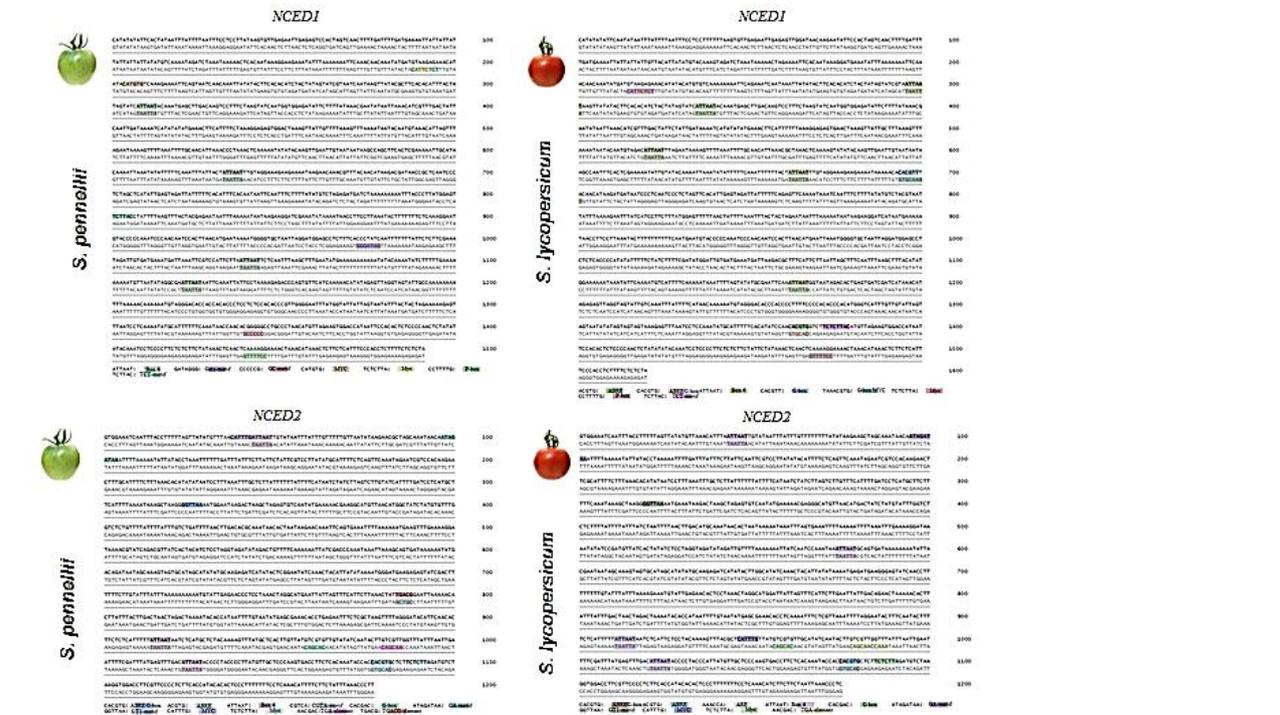


Рисунок 3.5.7 – Регуляторные элементы, идентифицированные в промоторных последовательностях S. lycopersicum сорта Heinz и S. pennellii LA0716 NCED1 и NCED2 генов в программах PlantCARE (ugent.be) и PLACE www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/.

Были идентифицированы цис-регуляторные элементы, выполняющие другие функции, а также элементы с неизвестной ролью. Среди идентифицированных регуляторных элементов три светочувствительных (TCCC-motif, chs-CMA1a и Box 4), пять гормончувствительных (ABRE3a, ABRE4, ERELEE4, CATATGGMSAUR и TGA-box) и два стресс-чувствительных (ANAERO3CONSENSUS и PREATPRODH) отсутствовали в промоторе *Z-ISO S. lycopersicum* (рис. 3.3.11). Анализ промоторных областей и 5' UTR генов *NCED* японского абрикоса *Prunus mume* показал сходный набор регуляторных мотивов, включающих свето-, стресс- и гормончувствительные элементы (Бабак и др., 2019; Бабак и др., 2020; Chen et al., 2023).

В анализированных последовательностях обоих генов *NCED* было выявлено наличие *cis*-активных элементов, реагирующих на метил-жасмонат (МЖе), что указывает на важность метил-жасмоната в регуляции *NCED*. Ранее для арабидопсиса было показано, что метил-жасмонат может активировать экспрессию *NCED2* при засухе и в листьях томата условиях холодового стресса, а также дефицит метил-жасмоната приводит к увеличению накопления транскриптов *NCED1* в томатах в ответ на водный стресс (Taylor et al., 2005; Cheng et al., 2022; Ding et al., 2023). Ранее была показана роль ТФ *MYC2*, ключевого компонента сигнального пути метил-жасмоната, во многих процессах развития и реакциях на стресс (Ding et al., 2023). В промоторе *NCED2* видов томата было выявлено два потенциальных сайта связывания с *MYC2* (рис.3.5.7), что подтверждает роль *MYC2* в регуляции экспрессии *NCED2*, накоплении АВА и устойчивости к холоду у томатов.

Также показано, что уровень полиморфизма промотора и 5' UTR зеленоплодного вида *S. pennellii* был в 1,38–1,58 раза выше, чем у красноплодного *S. lycopersicum*.

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

MADS-доменный транскрипционный фактор (Ripening Inhibiter) *RIN* (SIMADS-*RIN*) является основным регулятором созревания плодов томатов. Он контролирует транскрипцию многочисленных генов, участвующих во всех стадиях процесса, включая ряд генов каротиногенеза и двух других основных транскрипционных факторов созревания *NOR* и *CNR* (Fujisawa et al., 2012; Qin et al., 2012; Fujisawa et al., 2013; Fujisawa et al., 2013; Karlova et al., 2014; Бабак и др., 2016; Quin et al., 2019).

Белок *RIN* в составе тетрадного транскрипционного комплекса с факторами *TAGL1* и *FUL1/2* активирует экспрессию регулируемых генов путем связывания со специфическими *CArG*-box последовательностями в их промоторах (Qin et al., 2016).

Способность RIN осуществлять активацию транскрипции зависит от его С-конца (Fujisawa et al., 2011). Ранее было показано, что сорта *S. lycopersicum*, несущие мутацию *rin*, сходны с дикорастущими зеленоплодными видами по морфологии и биохимическому составу плодов (Karlova et al., 2014). Таким образом, плоды как дикорастущих зеленоплодных видов, так и растения, несущие мутацию *rin* сохраняют зеленую окраску спелого плода, и дольше сохраняют твердость по мере созревания. В основе таких эффектов лежит *rin* мутация, которая подавляет клеточное дыхание и связанное с этим процессом высвобождение этилена, который ингибирует накопление каротиноидов, размягчение плодов и продукцию ароматических соединений (Karlova et al., 2014). Показано, что мутация *rin* связана с делецией С-концевого домена RIN, в результате чего не происходит формирования транскрипционного комплекса и активации регулируемых генов участвующих в созревании плодов (Li et al., 2018; Li et al., 2019).

Таким образом, можно предположить, что различия в созревании плодов между зеленоплодными и красноплодными видами могут быть связаны с мутациями гена *RIN* и его белкового продукта. В связи с этим было интересно проанализировать последовательность гена *RIN* у красноплодных и зеленоплодных видов и определить профили экспрессии *RIN* вместе с генами мишеней *RIN*, участвующих в биосинтезе каротиноидов.

Последовательность гена *RIN* была идентифицирована (амплифицирована, клонирована и секвенирована) у двух красноплодных сортов *S. lycopersicum* (сорта Heinz и Zemba) и у трех зеленоплодных видов (*S. habrochaites* LA2144, *S. neorickii* LA1326 и *S. peruvianum* 4361). Дополнительно из базы данных были взяты последовательности еще у зеленоплодного вида *S. pennellii* (Gene ID: 107014532).

Все проанализированные образцы видов томата имели одинаковую структуру гена *RIN*, который содержал восемь экзонов и семь интронов; длина гена варьировала от 5288 (сорт Heinz) до 5742 п.н. (*S. peruvianum*) (рис.3.6.1). Ранее было показано, что экспрессия локуса RIN продуцирует три разных транскрипта: RIN1 и RIN2 и химерный RIN-МС, который ранее был идентифицирован у мутанта *rin/rin* *S. lycopersicum*. Разница в мРНК этих транскриптов заключается в их длине, связанной с различиями в сплайсинге (личные сообщения Слугиной М.А.).

Анализ мРНК показал, что последовательности и двух красноплодных сортов, и образцы четырех зеленоплодных видов (*S. arcanum*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. neorickii*) образовывали длинный транскрипт *RIN1*(=*RIN*) (рис.3.6.1).

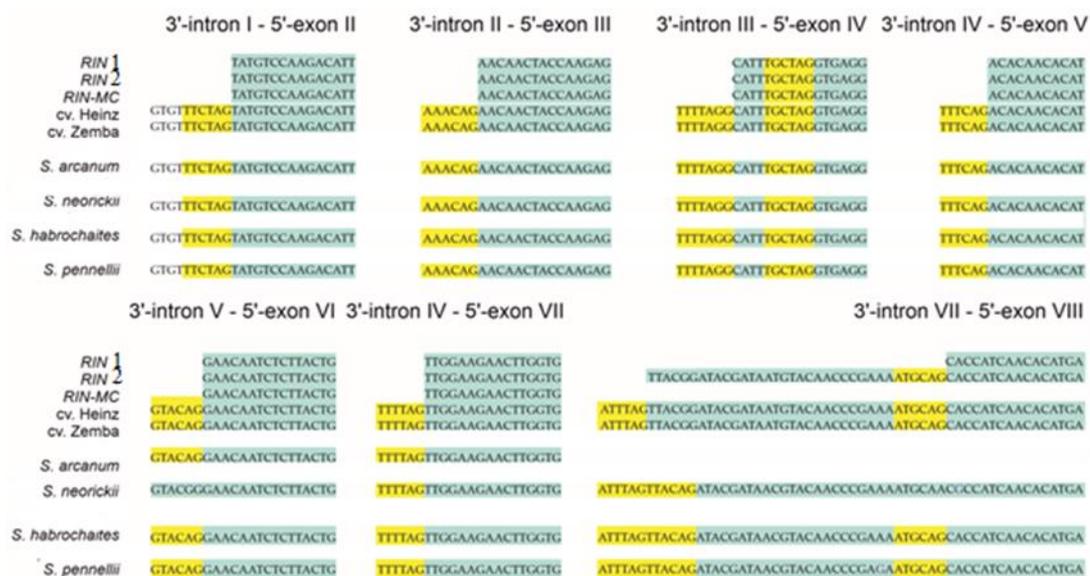


Рисунок 3.6.1 – Границы экзон/интронов и сайты 3'-сплайсинга (выделенные желтым), идентифицированные в генах *RIN* у образцов красноплодных и зеленоплодных видов томата.

Ген *RIN* был амплифицирован, клонирован и секвенирован с использованием разработанных праймеров (табл. 2.1.2). Уровень выявленного полиморфизма *RIN* у проанализированных образцов томатов составил 6,8%: всего выявлено 390 SNPs; среди них 39 были обнаружены в сортах *S. lycopersicum* и 351 в дикорастущих зеленоплодных видах. Среди SNP находящихся в экзонах, 14 были несинонимичными у дикорастущих видов по сравнению с сортами *S. lycopersicum*; пять аминокислотных замен были локализованы в консервативном ДНК-связывающем MADS-доме. Не выявлено никаких замен, характерных только для зеленоплодных или красноплодных видов.

Таким образом, структура анализируемых последовательностей *RIN* была сходной как у красноплодных сортов *S. lycopersicum*, так и у образцов зеленоплодных видов томата. И у зеленоплодных видов не было выявлено делеции в С-концевой области белка, характерной для несозревающего мутанта *rin*, которая начиналась в интроне VII и включала весь экзон VIII (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*, так как первичные последовательности, что у эволюционно более молодых красноплодных и более древних зеленоплодных видов были одинаковыми.

Ранее в лаборатории был проведен анализ промоторных областей гена *RIN* у сорта Heinz и зеленоплодных видов *S. habrochaites* LA2144 и *S. pennellii*, который не выявил существенных различий в последовательностях (личные сообщения Слугиной М.А.).

### 3.6.1. Экспрессия *RIN* и его генов-мишеней в динамике созревания плодов у красноплодных сортов *S. lycopersicum* и дикорастущих зеленоплодных видов

Транскрипцию *RIN* методом РВ-PCR определяли в плодах на различных стадиях созревания у двух красноплодных сортов *S. lycopersicum* и образцов двух зеленоплодных видов *S. habrochaites* и *S. peruvianum*. Для анализа экспрессии *RIN* были использованы праймеры MADS-RINRTF и I1RINRTR (табл. 2.2).

Как следует из рисунка 3.6.2. у всех образцов ген *RIN* экспрессировался на поздних стадиях созревания. У красноплодных сортов максимальный уровень наблюдался в плодах на стадии созревания BR и RR. У дикорастущих зеленоплодных видов *S. habrochaites* и *S. peruvianum* экспрессия *RIN* наблюдалась как в твердых, так и в мягких плодах на стадиях MG и RF соответственно. Таким образом, время экспрессии *RIN* у видов томата одинаковое, однако уровни экспрессии у красноплодного вида в 4—5 раза выше, чем зеленоплодных *habrochaites* и *S. peruvianum* соответственно (рис.3.6.2).

Мы проанализировали паттерны экспрессии предполагаемых генов-мишеней *RIN*, связанных с биосинтезом каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *Z-ISO* и *ZDS*), которые ранее были определены как гены-мишени *RIN* (Qin et al., 2016).

Экспрессия плодоспецифичного гена *PSY1* у сортов *S. lycopersicum* повышалась во время созревания плодов и была достаточно высокой в плодах на последних стадиях BR и RR (рис. 3.6.3).

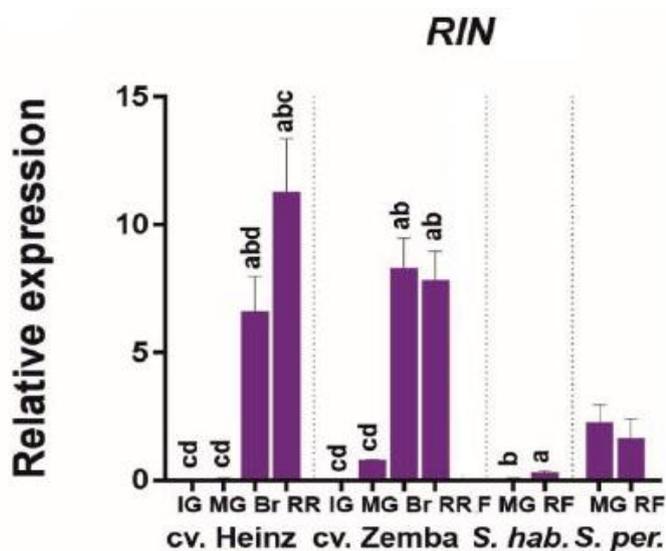


Рисунок 3.6.2 – Количественный анализ экспрессии методом РВ-ПЦР в сорте Heinz и Zemba, *S. habr.* (*S. habrochaites*); *S. per.* (*S. peruvianum*); IG, незрелый зеленый плод; MG, зрелый зеленый плод; BR, переходный плод; RR, спелый красный плод; RF, спелый плод. Строчные буквы над полосами указывают на статистически значимые различия. ( $p < 0,005$ ) между экспрессией генов в разных органах образца: IG, a; MG, b; BR, c; RR (RF), d.

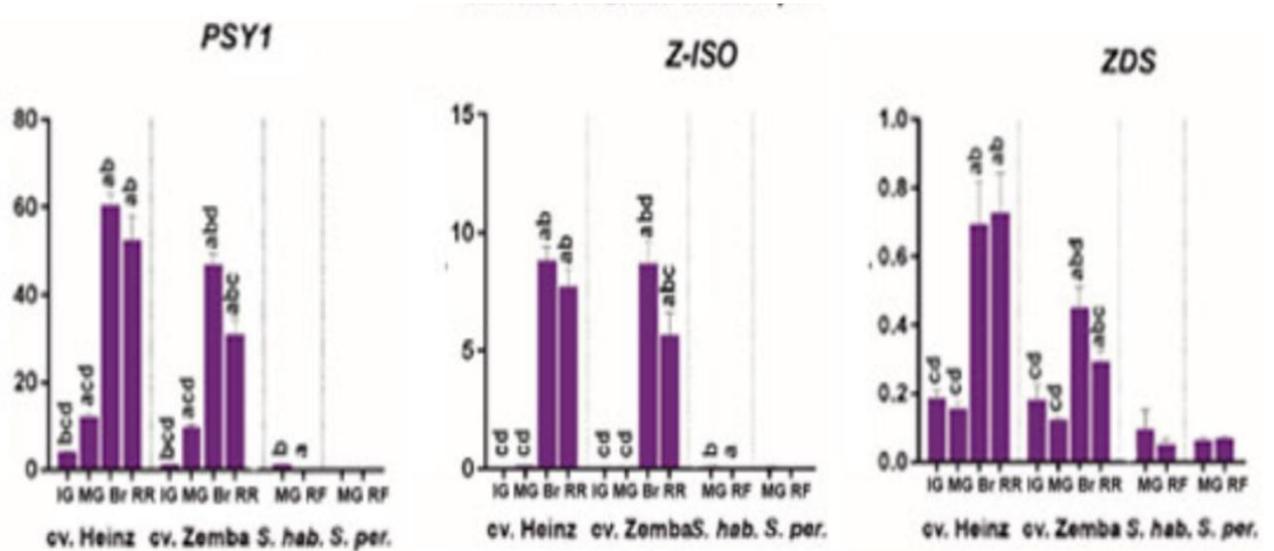


Рисунок 3.6.3 – Экспрессия генов-мишеней *RIN* при созревании плодов томата в сортах (Heinz и Zemba), *S. hab.* (*S. habrochaites*); *S. per.* (*S. peruvianum*); обозначения аналогичны рис. 3.6.2.

*PSY1* в плодах у образцов зеленоплодных видов транскрибировался в следовых количествах. Экспрессия *PSY2*, которая в основном наблюдается в хлоропластах, была одинаковой в листьях и плодах. Только у *S. peruvianum* наблюдалось повышение экспрессии на стадии RF в плодах (рис.3.6.3). Экспрессия *Z-ISO* наблюдалась только в плодах на стадиях BR и RR в сортах *S. lycopersicum*. Экспрессия *Z-ISO* на гораздо более низком уровне детектировалась у зеленоплодных видов на последних стадиях созревания плода. Экспрессия *ZDS* была обнаружена во всех протестированных образцах. Экспрессия *ZDS* была самой сильной у сортов *S. lycopersicum*, где она достигает максимумов в плодах на стадии BR и RR и самой слабой у *S. peruvianum* (рис. 3.6.3).

Таким образом, у всех анализируемых генов-мишеней ТФ *RIN* 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. Следовательно, наблюдается прямая корреляция между уровнями экспрессией регуляторного гена *RIN* и экспрессией его генов-мишеней.

Также в спелых плодах красноплодных сортов Heinz и Земба плодов зеленоплодных видов *S. peruvianum* *S. habrochaites* было определено содержание каротиноидов (табл.3.6.1).

В плодах на стадии RR в сортах *S. lycopersicum* содержание каротиноидов (общих, ликопина и  $\beta$ -каротина) было одинаково высоким, тогда как в спелых плодах зеленоплодных видов общее содержание каротиноидов было ниже, примерно в 10 раз.

Уровень  $\beta$ -каротина был аналогичен (*S. peruvianum*) или ниже в 2–7 раз (у *S. habrochaites*), ликопин в спелых плодах у зеленоплодных видов отсутствовал (табл. 3.6.1.).

Таблица 3.6.1. Содержание каротиноидов в спелых плодах

Вид	Содержание пигментов в спелых плодах, мкг/г сырого веса		
	Общие каротиноиды	Ликопин	$\beta$ -каротин
<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz	0.2197 $\pm$ 0.0398	0.1592 $\pm$ 0.0386	0.0212 $\pm$ 0.0037
<i>S. lycopersicum</i> cv. Zembra	0.2701 $\pm$ 0.0822	0.1488 $\pm$ 0.0466	0.0219 $\pm$ 0.034
<i>S. peruvianum</i>	0.0195 $\pm$ 0.0018	0	0.0242 $\pm$ 0.0045
<i>S. habrochaites</i>	0.0189 $\pm$ 0.0065	0	0.0099 $\pm$ 0.0034

Проведенная идентификация и анализ последовательностей гена *RIN* у сортов *S. lycopersicum* и образцов дикорастущих зеленоплодных видов томата, показали, что, несмотря на эти различия, структура гена *RIN* дикорастущих зеленоплодных видов и эволюционно более позднего красноплодного *S. lycopersicum* одинакова и единичные аминокислотные замены несущественны для функции регуляторного белка и активации нижележащих генов каротиногенеза.

Проведенный анализ последовательностей ключевых генов каротиногенеза (*PSYI*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *CRTISO-L1*, *CRTISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) также не выявил значительных изменений в первичных последовательностях, которые могли бы значительно влиять на функции данных белков между красноплодными и зеленоплодными видами томата. Также не было выявлено значительных различий в регуляторных последовательностях этих генов и, главное, в как количестве, так и в расположении CArG-box-сайтов связывания *RIN* в промоторах регулируемых генов биосинтеза каротиноидов. Основная разница заключалась в уровнях экспрессии анализируемых генов каротиногенеза в динамике созревания плодов: у эволюционно более древних зеленоплодных видов экспрессия этих генов в плодах либо отсутствовала (*PSYI*, *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 созревания плодов (стадии BR и RR).

Обобщая вышеизложенные биохимические и молекулярные данные, можно предположить следующую схему регуляции каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата (рис. 3.6.4).

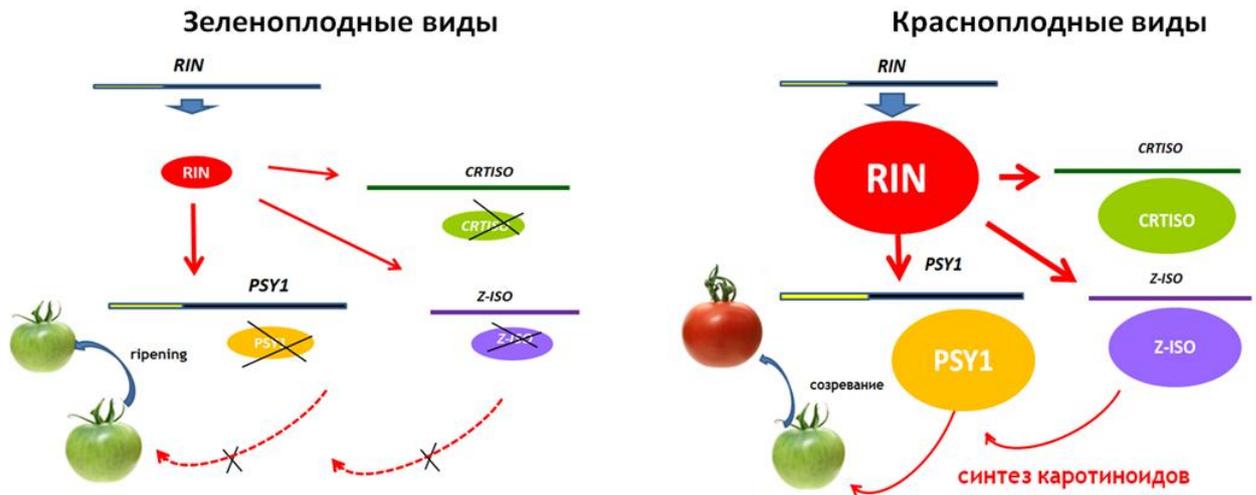


Рисунок 3.6.4 – Предполагаемая схема регуляции каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата. Крестиком показано отсутствие белка.

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 не происходит активации транскрипции нижестоящих генов каротиногенеза, либо она крайне низка, что не приводит к синтезу каротиноидов в плодах, и, как следствие, окраска плодов остается зеленой (рис.3.6.3а). В результате эволюции у красноплодных видов возникли изменения, приведшие к активации транскрипции гена *RIN* в плодах; белка RIN стало синтезироваться много на поздних стадиях созревания плода. ТФ RIN активирует транскрипцию нижестоящих генов каротиногенеза, начинается активный синтез каротиноидов и плод краснеет (рис.3.6.3б).

Так как существенных различий в регуляторных последовательностях самого гена *RIN* у красноплодных и зеленоплодных видов не выявлено, при этом у видов разница в уровнях транскрипции в плодах на поздних стадиях значительна, то можно предположить либо эпигенетические причины (деметилование промотора *RIN* у красноплодных видов), либо активность вышестоящего ТФ, который приводит к активации экспрессии *RIN* у красноплодных видов.

Таким образом, эволюционные преобразования, в том числе приведшие к активации экспрессии *RIN*, могли способствовать возникновению красноплодных видов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каротиноиды являются одними из наиболее значимых вторичных метаболитов растений, основной функцией которых является участие в фотосинтезе в составе структурных компонентов фотосистем и защите от оксидативного стресса. Также каротиноиды, являются субстратами для синтеза фитогормонов, прежде всего абсцизовой кислоты, тем самым участвуя в регуляции оттогенеза. Кроме того, как сами каротиноиды, так и их производные участвуют в формировании устойчивости растений к различным абиотическим стрессам. Также каротиноиды способствуют опылению и распространению семян, придавая цветкам и плодам различные оттенки желто-красной окраски. Такая вовлеченность каротиноидов в различные клеточные процессы говорит об их значимости для эволюции растений.

Целью данной работы стало использование комплексного морфофизиологического, молекулярно-генетического и биохимического подхода для структурно-функциональной характеристики генов метаболизма каротиноидов в различных органах и в процессе созревания плода у образцов видов томата секции *Lycopersicon*. Данная секция рода *Solanum*, включающая 12 дикорастущих и культивируемый агрономически значимый вид томата *S. lycopersicum*, интересна тем, что представляет идеальную модельную систему для структурного и функционального анализа генов биосинтеза каротиноидов. С одной стороны, виды томата имеют высокую синтению геномов, но при этом достаточно разнообразны по морфологии и биохимии. Прежде всего, это касается окраски спелых плодов, определяемое качественным и количественным составом каротиноидов. Виды секции *Lycopersicon* делятся на два типа: эволюционно более ранние зеленоплодные виды (*S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. neorickii*) и эволюционно более и красноплодные (*S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum*) и промежуточные с эволюционной точки зрения желтоплодные (*S. cheesmaniae*, *S. galapagense*) виды (Peralta et al., 2008). Таким образом, у дикорастущих и культивируемого видов томата окраска зрелого плода, как результат качественного и количественного состава каротиноидов, представлена достаточно широким спектром, что делает данную группу хорошей модельной системой для изучения синтеза и накопления каротиноидов в плодах и их характеристика позволит прояснить особенности и эволюцию генов каротиногенеза.

В работе был проведён сравнительный анализ биохимического состава каротиноидов в листьях и плодах в динамике созревания у образцов красноплодных (включая сорта *S. lycopersicum* с различной окраской спелого плода), желтоплодных и зеленоплодных дикорастущих видов. Методом спектрофотометрии и HPLC было показано, что качественный и количественный состав каротиноидов в листьях образцов красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видов относительно постоянен и представлен лютеином,  $\beta$ -крипсоксантином и виолоксантином, из чего можно заключить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях.

В процессе созревания плодов разных видов томата происходят качественные и количественные изменения в составе каротиноидов. При этом для зеленоплодных и красноплодных видов характерна общая тенденция накопления каротиноидов от низкого количества на ранних стадиях роста плода стадиях IG и MG до максимального содержания (с небольшим повышением для зеленоплодных и резким для красноплодных видов) на поздней стадии созревания RR/FR.

При созревании плодов у образцов зеленоплодных видов содержание каротиноидов возрастает, но не значительно. При этом состав каротиноидов сопоставим с таковым в листьях. Основным каротиноидом в плодах диких зеленоплодных видов являлся  $\beta$ -каротин; ликопин не детектируется.

Красноплодные виды, наоборот, характеризуются резким увеличением синтеза общих каротиноидов, что в основном связано с синтезом и накоплением ликопина, количество которого повышается по мере созревания плода. В целом общее содержание каротиноидов у зеленоплодных видов было низким и составляло 10 мкг/г СМ на стадии MG и возросло до 20 мкг/г СМ на стадии RF, что в 25–30 раз меньше, чем у красноплодных *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и желтоплодного вида *S. cheesmaniae*. Красноплодные виды характеризовались резким повышением синтеза общих каротиноидов и прежде всего ликопина по мере созревания плода, который увеличивался у *S. pimpinellifolium* в 46.6 раза в процессе созревания плодов и у *S. lycopersicum* в 100 раз.

В работе были идентифицированы (клонированы и секвенированы) полноразмерные последовательности ключевых генов биосинтеза каротиноидов фитоенсинтазы *PSYI* и  $\zeta$ -каротин изомеразы *Z-ISO* у 21 образца двенадцати культивируемых сортов томата и девяти дикорастущих (красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных) видов. Проведенный анализ структуры генов и меж- и внутривидового полиморфизма показал отсутствие отличий в экзон/интронных структурах, равно как и отличий в составе основных доменов и мотивов белков. Общий полиморфизм

проанализированных генов составил 3,87% для *PSY1* (для сортов) и 14,0% для полногеномных последовательностей (для видов) 11,0% для *Z-ISO*. В то же время было показано, что наибольшее генетическое разнообразие наблюдается у наиболее древних зеленоплодных видов томата, в то время как эволюционно более молодые виды характеризовались низкими уровнями варибельности. Сравнительный анализ показал, что окраска зрелого плода томата у образцов выборки сортов может быть соотнесена с присутствием определенных аллельных вариантов *SIPSY1*.

Все идентифицированные гомологи белков *PSY1* и *Z-ISO* красноплодных и зеленоплодных видов томата были высоко консервативными, выявленные аминокислотные замены (даже радикальные) не приводили к изменению третичных структур белка; имели одинаковые функционально важные остатки, что указывает на то, что ферменты должны иметь одинаковый каталитический механизм и указывают на то, что собственно каталитическая функция гомологичных белков *PSY1* и *Z-ISO* в каротиногенезе сохраняется как у эволюционно более древних зеленоплодных, так и красноплодных видов томата, включая доместифицированный вид *S.lycopersicum*. Проведенный экспрессионный анализ ген *PSY1* у красноплодных, эволюционно более молодых видов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* (как у красноплодных, так и желтоплодных сортов), показал, что он экспрессировался в плодах в процессе созревания, постоянно увеличивалась с очень низкого уровня на стадии IG до высоких на стадиях BR и RR. Аналогичная динамика наблюдалась у желтоплодного *S. cheesmaniae*, у которого экспрессия гена *PSY1* повышалась в процессе развития плода, но уровень экспрессии был примерно в 5-7 раз ниже у красноплодных *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*. У зеленоплодных видов транскрипция *PSY1* в плодах также была обнаружена во всех протестированных тканях; однако, в отличие от желтоплодного *S. cheesmaniae* и красноплодных видов, уровень экспрессии *PSY1* был низким в плодах как на стадии MG, так и на стадии полной спелости FR, где был примерно в 5–13 раз ниже, чем у желтоплодного *S. cheesmaniae*, и в 65 раз ниже, чем у красноплодных и был сопоставим с уровнем экспрессии в листьях. Аналогичным образом, транскрипция *Z-ISO* наблюдалась в листьях и плодах анализируемых видов. В процессе созревания плодов экспрессия *Z-ISO* возрастала и 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 желтоплодным видом и зеленоплодными видами.

Сравнение содержания каротиноидов в спелых плодах у анализируемых видов томата с экспрессии *PSY1* и *Z-ISO* выявило прямую корреляцию. Помимо корреляции с

содержанием каротиноидов в зрелых плодах, также была выявлена положительная корреляция между содержанием каротиноидов в процессе созревания плода и уровнями транскрипции *Z-ISO*, что говорит о том, что содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется уровнем экспрессии *Z-ISO*, определяя количество бесцветных предшественников окрашенных каротиноидов.

Каротин-*cis-trans*-изомеразы (каротиноид-изомеразы) *CRTISO*, которая так же считается одним из основных ферментов каротиногенеза в плодах томата, катализирует реакцию *cis-trans*-изомеризации с образованием  $\alpha/\beta$ -каротинов и их производных. В геноме *S. lycopersicum in silico* было выявлено три гена-гомолога каротиноид-изомераз: *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2*. Сравнительный анализ полученных кДНК *CrtISO* и его гомологов у пяти видов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. habrohaites* и *S. pennellii*) томата показали, что все они имели одинаковую экзон-интронную структуру. Общий уровень межвидового полиморфизма кодирующих последовательностей был достаточно низок и составил 1.5-2.0%. Проведенный экспрессионный анализ обнаружил транскрипты всех трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов. Однако, в плодах уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был крайне в сравнении с *CrtISO*, который наиболее высоко экспрессировался у *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrohaites*, соответственно). Проведенный филогенетический анализ полученных ортологов каротин-*cis-trans*-изомераз свидетельствует о более древнем происхождении *CrtISO-L2*, а также о большем сходстве белков *CrtISO* и *CrtISO-L1* и позволяет предположить, что возникновение этих трех генов предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

Апокаротиноиды, включающие крайне важные для роста и развития растений гормоны (абсцизовая кислота, стриголактоны), и летучие соединения, являются производными каротиноидов. Для характеристики *NCED1* и *NCED2* генов, контролирующих переход к апокаротиноидам, были выбраны пять видов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. habrohaites* и *S. pennellii*). Для всех пяти видов томата были получены и охарактеризованы полногеномные последовательности гомологичных генов *NCED1* и *NCED2*, включая 5'-UTR и промоторные области. Проведенный структурно-филогенетический анализ гомологов *NCED* у видов томата показал, что оба гена *NCED1* и *NCED2* являются безинтронными и идентичны друг другу на 74% (на белковом уровне – 71%); имеют сходную последовательность NCBI-CCD консервативного домена. Анализ консервативных доменов показал, что *NCED1* и *NCED2* у всех анализируемых видов томата имеют сходное строение и порядок доменов и

мотивов. Всего было у белков идентифицировано 24 консервативных мотивов. Из них 15 сохраняются в *NCED1* и *NCED2*, что указывает на то, что эти мотивы обеспечивают выполнение общей функции.

Показано совместное участие генов *NCED1* и *NCED2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. При этом анализ паттернов экспрессии предполагают разделение функций *NCED* между двумя ферментами, при этом ключевая роль принадлежит гену *NCED1*, пик активности которого приходится на стадию смены окраски плода. Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *NCED1* и *NCED2* с содержанием  $\beta$ -каротина может говорить о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов *NCED*.

Помимо структурных генов были получены и проанализированы последовательности транскрипционного фактора *RIN*, который является основным регулятором созревания плодов томатов. Анализ полученных последовательностей гена транскрипционного фактора *RIN*, регулирующего гены каротиногенеза, у красноплодных сортов *S. lycopersicum* (сорта Heinz и Zomba) и образцов трех зеленоплодных видов *S. habrochaites*, *S. neorickii* и *S. peruvianum* не выявил значимых различий. При этом показан высокий уровень экспрессии *RIN* у красноплодных видов и отсутствие/минимальная экспрессия у зеленоплодных. Показана прямая корреляция между уровнями экспрессией регуляторного гена *RIN* и экспрессией его генов-мишеней.

Поведенный анализ генов каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата позволил предложить возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов. На основании полученных в данной работе данных можно предположить, что у зеленоплодных видов ген *RIN* не транскрибируется, не происходит активации транскрипции генов каротиногенеза, прежде всего *PSY* и *Z-ISO* и не идет синтез каротиноидов. У красноплодных видов возникли ароморфозы, приведшие к активации транскрипции гена *RIN* в плодах; белка *RIN* стало много на поздних стадиях созревания плода. ТФ *RIN* активирует транскрипцию генов каротиногенеза, начинается активный синтез каротиноидов и плод краснеет.

Кратко полученные результаты можно сформулировать в виде следующих **ВЫВОДОВ:**

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.
- профиль 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  $\beta$ -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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аджиева, В. Ф. Использование молекулярных маркеров для создания лежких гибридов томата с высоким содержанием каротиноидов / В. Ф. Аджиева, Н. А. Некрашевич, О. Г. Бабак, Л. А. Мишин, А. В. Кильчевский // Докл. Нац. Акад. Наук Беларуси. – 2016. – т. 60. – №4.
2. Бабак, О. Г. Изучение полиморфизма генов *MYB*-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска днк-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов / О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Т. В. Никитинская, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский // Докл. Нац. Акад. Наук Беларуси. – 2019. – т. 63. – №6. – с. 721–729.
3. Бабак, О. Г. Анализ полиморфизма гена *SLMYB12*, детерминирующего биосинтез халкон-нарингенина в кожице плодов томата, и его влияния на накопление ликопина / О. Г. Бабак, С. И. Игнатова, Н. А. Голубкина, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, Т. В. Никитинская, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский // Докл. Нац. Акад. Наук Беларуси. – 2020. – т. 64. – №6. – с. 702–712.
4. Голубкина, Н. А. Биологическое значение каротиноидов / Н. А. Голубкина, О. Н. Пышная, Н. В. Бондарева // Овощи России. – 2010. – Т. 2. – № 26. – С. 26-40.
5. Кулакова, А. В. Вариабельность генома отечественных сортов томата: данные AFLP-анализа / А. В. Кулакова, Е. А. Дьяченко, А. В. Щенникова, О. Н. Пышная, Е. А. Джос // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – т. 26. – № 7. – с. 652-661.
6. Курина, А.Б. Биохимический состав плодов томата различной окраски / А. Б. Курина, А. Е. Соловьева, И. Е. Храпалова, А. М. Артемьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – т. 25. – № 5. – с. 514-527.
7. Ладыгин, В. Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Ладыгин В. Г // Вопросы Современной Альгологии. – 2015. – С. 87.
8. Орловская, О.А. Ассоциация уровня общего содержания каротиноидов в зерне кукурузы (*Zea mays L.*) с аллельным полиморфизмом сайта InDel1 гена *PSY* / О. А. Орловская, С. И. Вакула, Л. В. Хотылева, А. В. Кильчевский // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. – №3. – С. 28-34.
9. Слугина, М. А. Структура, вариабельность и экспрессия новых гомологов генов углеводного метаболизма *TAI*, *LIN7*, *SUS1*, *PHO1a* дикорастущих и культивируемых видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*): специальность 03.01.03 «Молекулярная биология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

- / Слугина Мария Андреевна; Московский государственный университет. Москва, 2018. – С. 133.
10. Смоликова, Г. Н. Каротиноиды семян: синтез, разнообразие и функции / Г. Н. Смоликова, С. С. Медведев // Физиология Растений. – 2015. – Т. 62. – № 1. – С. 3-16.
  11. Соловченко, А. Е. Пигментный состав, оптические свойства и устойчивость к фотодеструкции микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, культивируемой при высокой освещенности / А. Е. Соловченко, О. Б. Чивкунова, И. П. Маслова // Физиология Растений. – 2011. – Т. 58. – № 1. – С. 12-20.
  12. Соловченко, А. Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей / А. Е. Соловченко // Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – № 1. – С. 3-16.
  13. Соловченко, А. Е. Физиологическая пластичность симбиотических микроводорослей рода *Desmodesmus* (*Chlorophyceae*) из беломорских беспозвоночных разных таксонов / А. Е. Соловченко, О. А. Горелова, О. И. Баулина // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 5. – С. 696-707.
  14. Шаптуренко, М. Н. Связь дифференциального днк-полиморфизма томата (*Solanum lycopersicum* L.) с гетеротическим потенциалом гибридов F1 / М. Н. Шаптуренко, Л. А. Тарутина, Л. А. Мишин, С. В. Кубрак, А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева // Докл. Нац. Акад. Наук беларуси. – 2016. – т. 60. – № 5.
  15. Affek, H. P. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves / H. P. Affek, D. Yakir // Plant Physiology. – 2002. – Т. 129. – № 1. – С. 269-277.
  16. Ahrazem, O. The specialized roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron / O. Ahrazem, G. Diretto, J. Argandoña Picazo, A. Fiore, Á. Rubio-Moraga, C. Rial, R. M. Varela, F. A. Macías, R. Castillo, E. Romano, L. Gómez-Gómez // Frontiers in Plant Science. – 2019. – Т. 10. – № 249.
  17. Ahuja, I. Phytoalexins in defense against pathogens / R. Kissen, A. M. Bones // Trends in plant science. – 2012. – Т. 17. – № 2. – С. 73–90.
  18. Alba, R. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato / R. Alba, M. M. Cordonnier-Pratt, L. H. Pratt // Plant physiology. – 2000. – Т. 123. – № 1. – С. 363–370.
  19. Alós, E. Manipulation of carotenoid content in plants to improve human health / E. Alós, M. J. Rodrigo, L. Zacarias // Sub-Cellular Biochemistry. – 2016. – Т. 79.

20. Alquézar, B. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation / B. Alquézar, L. Zacarías, M. J. Rodrigo // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – T. 60. – № 6. – C. 1783-1797.
21. Ampomah-Dwamena, C. The Phytoene synthase gene family of apple (*Malus domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content / C. Ampomah-Dwamena, N. Driedonks, D. Lewis, M. Shumskaya, X. Chen, E. T. Wurtzel, R. V. Espley, A. C Allan // *BMC Plant Biology*. – 2015. – T. 15. – № 1.
22. Anwar, S. Epigenetic control of carotenogenesis during plant development / S. Anwar, E. Brenya, Y. Alagoz, C. I. Cazzonelli // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2021. – T. 40. – № 1. – C. 23-48.
23. Araceli, A. C. Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst / A. C. Araceli, C. M. Elda, L. G. Edmundo, G. P. Ernesto // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2007. – T. 70. – № 1-3. – C. 69-76.
24. Arango, J. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses / J. Arango, F. Wüst, P. Beyer, R. Welsch // *Planta*. – 2010. – T. 232. – № 5. – C. 1251–1262.
25. Araújo, A. H. Nucleotide diversity of a major carotenoid biosynthetic pathway gene in wild and cultivated *Solanum* (Section Lycopersicon) species / A. H. Araújo, M. E. D. N. Fonseca, L. S. Boiteux // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2007. – T. 19. – № 3.
26. Araya-Garay, J. M. Cloning and functional expression of zeta-carotene desaturase, a novel carotenoid biosynthesis gene from *Ficus carica* / J. M. Araya-Garay, L. Feijoo-Siota, P. Veiga-Crespo, A. Sánchez-Pérez, G. T. Villa // *International Journal of Microbiology & Advanced Immunology*. – 2014. – C. 32-40.
27. Armstrong, G. A. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. / G. A. Armstrong, J. E. Hearst // *The FASEB Journal*. – 1996.
28. Ashraf, M. A. Environmental stress and secondary metabolites in plants / M. A. Ashraf, M. Iqbal, R. Rasheed // *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. – 2018. – C. 153-167.
29. Bai, Y. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? / Y. Bai, P. Lindhout // *Annals of botany*. – 2007. – T. 100. – № 5. – C. 1085–1094.

30. Barboza, G. E. Four new species of *Capsicum* (*Solanaceae*) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus / G. E. Barboza, C. Carrizo García, S. Leiva González, M. Scaldaferrro, X. Reyes // PLoS ONE. – 2019. – T. 14. – № 1.
31. Barnett, J. R. Variation in ripe fruit volatiles across the tomato clade: An evolutionary framework for studying fruit scent diversity in a crop wild relative / J. R. Barnett, M. T. Denise, A. L. Caicedo // American Journal of Botany – 2023. – T. 110. – № 9.
32. Bartley, G. E. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase / G. E. Bartley, P. A. Scolnik // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268. – № 34. – C. 25718-25721.
33. Bartley, G. E. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health / G. E. Bartley, P. A. Scolnik // Plant Cell. – 1995. – T. 7. – № 7. – C. 1027-1038.
34. Barton, K. E. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (*Plantaginaceae*): Genetic variation and trade-offs / K. E. Barton // American Journal of Botany. – 2007. – T. 94. – № 1. – C. 56-66.
35. Bedinger, P. A. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein / P. A. Bedinger, R. T. Chetelat, B. McClure // Journal of Experimental Botany. – 2016. – T. 24. – № 1. – C. 1870-1874.
36. Beltrán, J. Control of carotenoid biosynthesis through a heme-based cis-trans isomerase / J. Beltrán, B. Kloss, J. P. Hosler, J. Geng, A. Liu, A. Modi, J. H. Dawson, M. Sono, M. Shumskaya, C. Ampomah-Dwamena, J. D. Love, E. T. Wurtzel // Nature chemical biology. – 2015. – T. 11. – № 8. – C. 598-605.
37. Bianchi, G. Carotenoids production and fruit quality changes during shelf life of peach *Prunus persica* (L.) Batsch cultivars harvested at two ripening stages / G. Bianchi, A. Rizzolo, M. Buccheri, V. Papa, M. Grassi, R. Lo Scalzo // Acta Horticulturae. – 2015. – T. 1084. – C. 717-724.
38. Bonina-Noseworthy, J. Carotenoid concentration and composition in winter squash: Variability associated with different cultivars, harvest maturities, and storage times / J. Bonina-Noseworthy, J. B. Loy, J. Curran-Celentano, R. Sideman, D. A. Kopsell // HortScience. – 2016. – T. 51. – № 5.
39. Bolger, A. The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii* / A. Bolger, F. Scossa, M. E. Bolger, C. Lanz, F. Maumus, T. Tohge, H. Quesneville, S. Alseekh, I. Sørensen, G. Lichtenstein, E. A. Fich, M. Conte, H. Keller, K. Schneeberger, R. Schwacke, I. Ofner, J. Vrebalov, Y. Xu, S. Osorio, S. A. Aflitos, E. Schijlen, J. M.

- Jiménez-Goméz, M. Ryngajllo, S. Kimura, R. Kumar, D. Koenig, L. R. Headland, J. N. Maloof, N. Sinha, R. C. van Ham, R. K. Lankhorst, L. Mao, A. Vogel, B. Arsova, R. Panstruga, Z. Fei, J. K. Rose, D. Zamir, F. Carrari, J. J. Giovannoni, D. Weigel, B. Usadel, A. R. Fernie. // *Nature Genetics*. – 2014. – T. 46. – № 9. – C. 1034-1038.
40. Böttger, A. Plant secondary metabolites and their general function in plants / A. Böttger, U. Vothknecht, C. Bolle, A. Wolf // *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co* – 2018. – C. 3-17.
41. Bouvier, F. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto) / F. Bouvier, O. Dogbo, B. Camara // *Science*. – 2003. – T. 300. – № 5628. – C. 2089-2091.
42. Bramley, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development / P. M. Bramley // *Journal of experimental botany* – 2002. – T. 53. – № 377. – C. 21073-2113.
43. Bürger, M. Stressed out about hormones: How plants orchestrate immunity / M. Bürger, J. Chory // *Cell host & microbe*. – 2019. – T. 26. – № 30. – C. 163-172.
44. Cao, H. A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases / H. Cao, H. Luo, H. Yuan, A. E. Mohamed, W. T. Theodore, W. Ralf, H. Yu-Jin, C. Lailiang, Li Li // *Plant Physiology*. – 2019. – T. 180. – № 4. – C. 1988-2003.
45. Campbell, O. E. Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling / O. E. Campbell, O. I. Padilla-Zakour // *Food Research International*. – 2013. – T. 54. – № 1. – C. 448-455.
46. Cazzonelli, C. I. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. T. 15 / C. I. Cazzonelli, B. J. Pogson // *Trends in plant science*. – 2010. – T. 15. – № 5. – C. 266-274.
47. Cheng, D. Genome-Wide Identification of CCD Gene Family in Six Cucurbitaceae Species and Its Expression Profiles in Melon / D. Cheng, Z. Wang, S. Li, J. Zhao, C. Wei, Y. Zhang // *Genes*. – 2015. – T. 2. – № 4. – C. 105–113.
48. Chen, Y. Isolation and characterization of the *Z-ISO* gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants / Y. Chen, F. Li, E. T. Wurtzel // *Plant physiology*. – 2010. – T. 153. – № 1. – C. 66–79.
49. Chen, L. Identified trans-splicing of *YELLOW-FRUITED TOMATO 2* encoding the PHYTOENE SYNTHASE 1 protein alters fruit color by map-based cloning, functional complementation and RACE / L. Chen, W. Li, Y. Li, X. Feng, K. Du, G. Wang, L. Zhao // *Plant Molecular Biology*. – 2019. – T. 100. – № 6. – C. 647-658.
50. Christianson, D. W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases / D. W. Christianson // *Chemical Reviews*. – 2017. – T. 117. – № 17. – C. 11570–11648.

51. Cooper, C. M. C-27 apocarotenoids in the flowers of *Boronia megastigma* (Nees) / C. M. Cooper, N. W. Davies, R. C. Menary // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – T. 51. – № 8. – C. 2384-2389.
52. Cunningham, Jr. F. X. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases / F. X. Cunningham Jr., E. Gantt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – T. 98. – № 5. – C. 2905-2910.
53. Cunningham, F. X. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants / F. X. Cunningham, E. Gantt // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1998. – № 49. – C. 557–583.
54. Davison, P. A. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis* // P. A. Davison, C. N. Hunter, P. Horton // Nature. – 2002. – T. 418. – № 6894. – C. 203–206.
55. Deineka, V. I. Determination of carotenoids of tomato fruits of different colors / V. I. Deineka, T. G. Burzhinskaya, L. A. Deineka, I. P. Blinova // Journal of Analytical Chemistry. – 2021. – T. 76. – № 2.
56. Del Río-Celestino, M. Quantification of carotenoids in zucchini (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*) cultivars cultivated in Almeria by liquid chromatography / M. Del Río-Celestino, P. Gómez, M. Villatoro-Pulido, M. Moya, I. Domínguez-Pérez, D. Martínez-Valdivieso, R. Font, A. Muñoz Serrano, A. Alonso-Moraga // Acta Horticulturae. – 2012. – T. 939.
57. Dias, M. G. European Database of carotenoid levels in foods. factors affecting carotenoid content / M. G. European, G. I. Borge, K. Kljak, A. I. Mandić, P. Mapelli-Brahm, B. Olmedilla-Alonso, A. M. Pintea, F. Ravasco, V. Tumbas Šaponjac, J. Sereikaitė, L. Vargas-Murga, J. J. Vulić, A. J. Meléndez-Martínez // Foods. – 2021. – T. 10. – № 5.
58. Dibari, B. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses / B. Dibari, F. Murat, A. Chosson, V. Gautier, C. Poncet, P. Lecomte, I. Mercier, H. Bergès, C. Pont, A. Blanco, J. Salse // BMC Genomics. – 2012. – T. 13. – № 1.
59. Ding, F. Jasmonate positively regulates cold tolerance by promoting ABA biosynthesis in tomato / F. Ding, X. Wang, Z. Li, M. Wang // Plants. – 2015. – T. 2. – № 4. – C. 105–113.
60. Diretto, G. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase / G. Diretto, R. Tavazza, R. Welsch, D. Pizzichini, F. Mourgues, V. Papacchioli, P. Beyer, G. Giuliano // BMC plant biology. – 2006. – T. 6. – № 13.

61. Ducreux, L.J. M. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein / L. J. M. Ducreux, W. L. Morris, P. E. Hedley, Shepherd, T., Davies, H. V., Millam, S., & Taylor, M. A // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – T. 56. – № 409. – C. 81-89.
62. Dzhos, E. A. Biologically active compounds transform during the ripening stages in greenhouse tomatoes / E. A. Dzhos, O. N. Pyshnaya, M. I. Mamedov, A. A. Baikov, M. S. Gins, Y. P. Tukuser, A. A. Matykina, D. R. Shafigullin, E. M. Gins, S. M. Motyleva // *SABRAO J. Breed. Genet.* – 2023. – T. 5. – № 2. – C. 533-540.
63. 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. – T. 9. – № 9. – C. 1-25.
64. Efremov G.I. Characterization of 15-cis- $\zeta$ -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. – T. 10. – № 11.
65. Eggersdorfer, M. Carotenoids in human nutrition and health / M. Eggersdorfer, A. Wyss // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2018. – № 652. – C. 18-26.
66. Miguel, E. Overlapping and specialized roles of tomato phytoene synthases in carotenoid and abscisic acid production / E. Miguel, E. Burbano-Erazo, M. Rodriguez-Concepcion // *Plant Physiology*. – 2023. – T.193. – № 5. – C. 2021-2036.
67. Eisenreich, W. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway / W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2004. – T. 61. – № 12. – C. 1401-1426.
68. Fantini, E. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing / E. Fantini, G. Falcone, S. Frusciante // *Plant Physiology*. – 2013. – T. 163. – № 2. – C. 986-998.
69. Fernandes, L. The unexplored potential of edible flowers lipids / L. Fernandes, E. Ramalhosa, J. A. Pereira, J. A. Saraiva, S. Casal // *Agriculture*. – 2018. – T. 8. – № 146.
70. Fini, A. Isoprene responses and functions in plants challenged by environmental pressures associated to climate change / A. Fini, C. Brunetti, F. Loreto, M. Centritto, F. Ferrini, M. Tattini // *Frontiers in plant science*. – 2017. – T. 8. – № 1281.
71. Flores, P. Genotypic variability of carotenoids in traditional tomato cultivars / P. Flores, E. Sánchez, J. Fenoll, P. Hellín // *Food Research International*. – 2017. – T. 100. – C. 510-516.

72. Flowerika, A. Characterization and expression analysis of phytoene synthase from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Flowerika, A. Alok, J. Kumar, N. Thakur, A. Pandey, A. K. Pandey, S. K. Upadhyay, S. Tiwari. // PLoS ONE. – 2016. – T. 11. – № 10.
73. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H sloane stanley // The Journal of biological chemistry. – 1957. – T. 226. – № 1. – C.497–509
74. Fraser, P. D. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. Evidence for tissue-specific gene expression / P. D. Fraser, M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schuch, P. M. Bramley // Plant Physiology. – 1994. – T. 105. – № 1. – C. 405-413.
75. Fraser, P. D. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts - Partial purification and biochemical properties / P. D. Fraser, W. Schuch, P. M. Bramley // Planta. – 2000. – T. 211. – № 3. – C. 361-369.
76. Fraser, P. D. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. / P. D. Fraser, P. M. Bramley // Progress in lipid research. – 2004. – T. 43. – № 3. – C. 228-265.
77. Fraser, P. D. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: Effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism / P. D. Fraser, E. M. A. Enfissi, J. M. Halket, M. R. Truesdale, D. Yu, C. Gerrish, P. M. Bramley // Plant Cell. – 2007. – T. 19. – C. 3194-3211.
78. Fraser, P. D. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit / P. D. Fraser, J. W. Kiano, M. R. Truesdale // Plant Molecular Biology. – 1999. – T. 40. – № 4. – C. 687-698.
79. Frassinetti, S. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from citrus spp / S. Frassinetti, L. Caltavuturo, M. Cini, C. M. Della Croce, B. E. Maserti, // Journal of Essential Oil Research. – 2011. – T. 23. – № 1. – C. 27–31.
80. Frusciante, S. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis / S. Frusciante, G. Diretto, M. Bruno, Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., Rubio-Moraga, A., Beyer, P., Gomez-Gomez, L., Al-Babili, S., & Giuliano, G. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – T. 111. – № 33. – C. 12246-12251.
81. Fu, Z. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSY1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species / Z. Fu, J. Yan, Y. Zheng, M. L. Warburton, J. H. Crouch, J. S Li // Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – T. 120. – № 4. – C. 709-720.
82. Fuciman, M. Role of xanthophylls in light harvesting in green plants: A Spectroscopic investigation of mutant LHCII and LHCb pigment-protein complexes / M. Fuciman, M. M.

- Enriquez, T. Polívka, Dall'Osto, L., Bassi, R., & Frank, H. A. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – T. 116. – № 12. – C. 3834-3849.
83. Fujisawa, M. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening / M. Fujisawa, T. Nakano, Y. Shima, Y. Ito, // *The Plant cell*. – 2013. – T. 25. – № 2. – C. 371–386.
84. Fujisawa, M. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation / M. Fujisawa, T. Nakano, Y. Ito // *BMC plant biology*. – 2011. – T. 11. – № 26.
85. Gallusci, P. DNA methylation and chromatin regulation during fleshy fruit development and ripening / P. Gallusci, C. Hodgman, E. Teyssier, G. B. Seymour // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – T. 7.
86. Galpaz, N. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus / N. A. Galpaz, G. Ronen, Z. Khalfa, D. Zamir, J. Hirschberg // *The Plant cell*. – 2006. – T. 18. – № 8. – C.1947–1960.
87. Galpaz, N. Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content / N. Galpaz, Q. Wang, N. Menda, D. Zamir, J. Hirschberg // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. – 2008. – T. 53. – № 5. – C. 717–730.
88. Giliberto, L. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content / L. Giliberto, G. Perrotta, P. Pallara, J. L. Weller, P. D., Fraser, P. M. Bramley, A. Fiore, M. Tavazza, G. Giuliano // *Plant physiology*. – 2005. – T. 137. – № 1. – C. 199–208.
89. Giorio, G. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - New data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns / G. Giorio, A. L. Stigliani, C. D'Ambrosio // *FEBS Journal*. – 2008. – T. 275. – № 3. – C. 527-535.
90. Giovannoni, J. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening / J. Giovannoni, C. Nguyen, B. Ampofo, S. Zhong, Z. Fei // *Annual Review of Plant Biology*. – 2017. – T. 68. – № 1. – C. 61-84.
91. Grassi, S. Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit // S. Grassi, G. Piro, M. J. Lee, Y. Zheng, Z. Fei, G. Dalessandro, J. J. Giovannoni, M. S. Lenucci // *BMC genomics*. – 2013. – T. 14. – № 781.

92. Gruszecki, W. I. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties / W. I. Gruszecki, K. Strzałka // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. – 2005. – T. 1740. – C. 108-115.
93. Guo, J. E. Histone deacetylase gene *SIHDT1* regulates tomato fruit ripening by affecting carotenoid accumulation and ethylene biosynthesis / J. E. Guo // *Plant Science*. – 2022. – T. 318.
94. Guzman, I. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. / I. Guzman, S. Hamby, J. Romero, P. W. Bosland, M. A. O'Connell // *Plant Science*. – 2010. – T. 179. – № 1-2. – C. 49-59.
95. Ha, S. H. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: Deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper / S. H. Ha, J. B. Kim, J. S. Park, S. W. Lee, K. J. Cho // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – T. 58. – № 12. – C. 3135-3144.
96. Hadacek, F. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives / F. Hadacek // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2002. – T. 21. – № 4. – C. 273-322.
97. Havaux, M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants / M. Havaux // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. – 2014. – T. 79. – № 4. – C. 597-606.
98. Hedden, P. Gibberellin biosynthesis and its regulation / P. Hedden, S. G. Thomas // *The Biochemical journal*. – 2012. – T. 444. – № 2. – C. 11-25.
99. Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants / J. Hirschberg // *Current opinion in plant biology*. – 2001. – T. 4. – № 3. – C. 210–218.
100. Hussein, R.A. Plants Secondary Metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants / R. A. Hussein, A. A. El-Anssary // *Herbal Medicine*. – 2019.
101. Howitt, C. A. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues / C. A. Howitt, B. J. Pogson // *Plant, cell & environment*. – 2006. – T. 29. – № 3. – C. 435-445.
102. Huang, F. C. Substrate promiscuity of *RdCCD1*, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena* / F. C. Huang, G. Horváth, P. Molnár, E. Turcsi, J. Deli, J. Schrader, G. Sandmann, H. Schmidt, W. Schwab // *Phytochemistry*. – 2009. – T. 70. – № 4. – C. 457-464.
103. Hou, X. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants / X. Hou, J. Rivers, P. León, R. P. McQuinn, B. J. Pogson // *Trends in plant science*. – 2020. – T. 228. – № 3. – C. 839–844.

104. Ibdah, M. Functional characterization of *CmCCDI*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon / M. Ibdah, Y. Azulay, V. Portnoy, Wasserman B, Bar E, Meir A, Burger Y, Hirschberg J, Schaffer AA, Katzir N, Tadmor Y, Lewinsohn E. // *Phytochemistry*. – 2006. – T. 67. – № 15. – C. 1579-1589.
105. Isaacson, T. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants / T. Isaacson, G. Ronen, D. Zamir, J. Hirschberg // *Plant Cell*. – 2002. – T. 14. – № 2. – C. 333-342.
106. Isaacson, T. Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants / T. Isaacson, I. Ohad, P. Beyer, J. Hirschberg // *Plant physiology*. – 2004. – T. 136. – № 4. – C. 4246–4255.
107. Islam, R. Phenolics and carotenoids contents and radical scavenging capacity of some selected solanaceous medicinal plants / R. Islam, M. N. Uddin, M. Ashrafuzzaman, M. I. U. Hoque // *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. – 2018. – T. 16. – № 1.
108. Jalil, S. U. Isoprenoids in plant protection against abiotic stress / S. U. Jalil, M. I. Ansari // *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress*. – 2020. – C. 424-436.
109. Jang, S. J. Phytoene Synthase 2 can compensate for the absence of *Psy1* in Pepper Fruit (*Capsicum annuum*) / S. J. Jang, H. B. Jeong, A. Jun // *Journal of Experimental Botany*. – 2019. – T. 71. – № 12. – C. 3417–3427.
110. Jardine, K. Dynamic balancing of isoprene carbon sources reflects photosynthetic and photorespiratory responses to temperature stress / K. Jardine, J. Chambers, E. G. Alves // *Plant Physiology*. – 2014. – T. 166. – № 4. – C. 2051-2064.
111. Javanmard, M. Characterization of biochemical traits of dog rose (*Rosa canina* L.) ecotypes in the central part of Iran / M. Javanmard, H. A. Asadi-Gharneh, P. Nikneshan // *Natural Product Research*. – 2018. – T. 32. – № 14.
112. Jeknić, Z. Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from tiger lily (*Lilium lancifolium* thunb. «splendens») / Z. Jeknić, J. T. Morr , S. Jeknić, S. Jevremović, A. Subotić, T. H. Chen // *Plant and Cell Physiology*. – 2012. – T. 53. – № 11. – C. 1899-1912.
113. Joyard, J. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways / J. Joyard, M. Ferro, C. Masselon, D. Seigneurin-Berny, D. Salvi, J. Garin, N. Rolland // *Molecular Plant*. – 2009. – T. 2. – № 6. – C. 1154-1180.

114. Jiang, H. Dietary vitamin and carotenoid intake and risk of age-related cataract / H. Jiang, Y. Yin, C. R. Wu, Y. Liu, F. Guo, M. Li, L. Ma // *The American journal of clinical nutrition*. – 2019. – T. 109. – № 2. – C. 43-54.
115. Kachanovsky, D. E. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids / D. E. Kachanovsky, S. Filler, T. Isaacson, J. Hirschberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012.
116. Kai, W. Functional analysis of *SINCE1* in pistil development and fruit set in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) / W. Kai, Y. Fu, J. Wang, B. Liang, Q. Li, P. Leng // *Scientific reports*. – 2019. – T. 9. – № 1.
117. Karlova, R. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening / K. Karlova, N. Chapman, K. David, G. C. Angenent, G. B. Seymour, R. A. de Maagd // *Journal of experimental botany*. – 2014. – T. 65. – № 16. – C. 4527–4514.
118. Karniel, U. Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis / U. Karniel, A. Koch, D. Zamir, J. Hirschberg // *Plant biotechnology journal*. – 2020. – T. 18. – № 11. – C. 2292–2303.
119. Kato, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit / M. Kato, Y. Ikoma, H. Matsumoto, M. Sugiura, H. Hyodo, M. Yano // *Plant Physiology*. – 2004. – T. 134. – № 2.
120. Kaur, N. Bioactive secondary metabolites of medicinal and aromatic plants and their disease-fighting properties / N. Kaur, T. Ahmed // *Medicinal and Aromatic Plants*. – 2021. – C. 113-142.
121. Khoo, H. E. Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables / H. E. Khoo, K. N. Prasad, K. W. Kong, Y. Jiang, A. Ismail // *Molecules*. – 2011. – T. 16. – № 2. – C. 1710-1738.
122. Kilambi, H. V. Chromoplast-specific carotenoid-associated protein appears to be important for enhanced accumulation of carotenoids in hp1 tomato fruits / H. V. Kilambi, R. Kumar, R. Sharma, Y. Sreelakshmi // *Plant Physiology*. – 2013. – T. 161. – № 4. – C. 2085-2101.
123. Kilambi, H. V. Green-fruited *Solanum habrochaites* lacks fruit-specific carotenogenesis due to metabolic and structural blocks / H. V. Kilambi, K. Manda, A. Rai, C. Charakana, J. Bagri, R. Sharma, Y. Sreelakshmi // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – T. 68. – № 17. – C. 4803-4819.
124. Kishor, D. S. Identification of an allelic variant of the *CsOr* gene controlling fruit endocarp color in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using Genotyping-By-Sequencing (GBS) and

- Whole-Genome Sequencing / D. S. Kishor, H. Y. Lee, H. Alavilli, You, C. R., Kim, J. G., Lee, S. Y., Kang, B. C., & Song, K. // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – T. 12.
125. Knapp, S. The tomato (*Solanum lycopersicum* L Solanaceae) and its botanical relatives / S. Knapp, I. E. Peralta // *The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2).
126. Koca Bozalan, N. Carotenoid profile, total phenolic content, and antioxidant activity of carrots / N. Koca Bozalan, F. Karadeniz // *International Journal of Food Properties*. – 2011. – T. 14. – № 5.
127. Kohlen, W. The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (*SICCD8*) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis / W. Kohlen, T. Charnikhova, M. Lammers, T. Pollina, P. Tóth, I. Haider, M. J. Pozo, R. A. de Maagd, C. Ruyter-Spira, H. J. Bouwmeester, J. A. López-Ráez // *The New phytologist*. – 2012. – T. 196. – № 2. – C. 535–547.
128. Koschmieder, J. Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications / J. Koschmieder, M. Fehling-Kaschek, P. Schaub, Ghisla, S. Brausemann, A. Timmer, J. & P. Beyer // *PLoS ONE*. – 2017. – T. 12. – № 11.
129. Koul, A. Identification and in silico characterization of cis-acting elements of genes involved in carotenoid biosynthesis in tomato / A. Koul, D. Sharma, S. Kaul, M. K. Dhar // *3 Biotech*. – 2019. – T. 9. – № 7.
130. Kumar, V. Fruit ripening mutants reveal cell metabolism and redox state during ripening / V. Kumar, M. Irfan, S. Ghosh, Chakraborty N, Chakraborty S, Datta A. // *Protoplasma*. – 2016. – T. 253. – № 2. – C. 581-594.
131. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular biology and evolution*. – 2016. – T. 33. – № 7. – C. 1870–1874.
132. Kira, L. Tissue-specific apocarotenoid glycosylation contributes to carotenoid homeostasis in *Arabidopsis* leaves / L. Kira, W. Florian, H. Michaela, P. Schaub, K. Gabriele Beisel, S. Matsubara, P. Beyer, R. Welsch // *Plant Physiology*. – 2015. – T. 168. – № 4. – C. 1550-1562.
133. Lado, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit development / J. Lado, L. Zacarías, M. J. Rodrigo // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2016. – T. 79. – C. 161-198.
134. Lang, Z. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit / Z. Lang, Y. Wang, K. Tang, D. Tang, T. Datsenka, J. Cheng, Y. Zhang, A. K. Handa, J. K. Zhu // *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – T. 114. – № 22. – C. 4511-4519.
- 135.Lee, J.M. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor *SIERF6* plays an important role in ripening and carotenoid accumulation / J. M. Lee, J. Joung, R. P. McQuinn, M. Chung, Z. Fei, D.M. Tieman, H.J. Klee, J.J Giovannoni // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. – 2012. – T. 70. – № 2. – C. 191–204.
- 136.Lenucci, M. S. Carotenoid content during tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening in traditional and high-pigment cultivars / M. S. Lenucci, A. Caccioppola, M. Durante, M. Serrone, L. Caroli, G. Piro, G. Dalessandro // *Italian Journal of Food Science*. – 2009. – T. 21. – № 4. – C. 461-472.
- 137.Lewinsohn, E. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses / E. Lewinsohn, Y. Sitrit, E. Bar, Y. Azulay, A. Meir, D. Zamir, Y. Tadmor // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – T. 53. – № 8. – C. 3142-3148.
- 138.Li, H. Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in H9c2 / H. Li, Z. Deng, R. Liu, S. Loewen, R. Tsao // *Food Chemistry*. – 2013. – T. 136. – № 2. – C. 878-888.
- 139.Li, F. *PSY3*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis / F. Li, R. Vallabhaneni, E. T. Wurtzel // *Plant Physiology*. – 2008. – T. 146. – № 3. – C. 1333-1345.
- 140.Li, L. Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation / L. Li, H. Yuan // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2013. – T. 539. – № 2. – C. 102-109.
- 141.Li, S. The *RIN-MC* fusion of MADS-Box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes / S. Li, H. Xu, Z. Ju, D. Cao, H. Zhu, D. Fu, D. Grierson, G. Qin, Y. Luo, B. Zhu // *Plant Physiol*. – 2018. – T. 176. – № 1. – C. 891-909.
- 142.Li, S. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network / S. Li, K. Chen, D. Grierson // *New Phytologist*. – 2019. – № 221. – C. 1724-1741.
- 143.Lisboa, M. P. Molecular evolution and diversification of phytoene synthase (*PSY*) gene family / P. M. Lisboa, D. Canal, J. P. C. Filgueiras, A. C. Turchetto- // *Genetics and Molecular Biology*. – 2022. – T. 45. – № 4.

- 144.Liu, X.  $\zeta$ -Carotene Isomerase Suppresses Tillering in Rice through the Coordinated Biosynthesis of Strigolactone and Abscisic Acid / X. Liu, Q. Hu, J. Yan, K. Sun, Y. Liang, M. Jia, X. Meng, S. Fang, Y. Wang, Y. Jing, G. Liu, D. Wu, C. Chu, S. M. Smith, J. Chu, Y. Wang, J. Li, B. Wang // *Molecular plant*. – 2020. – T. 13. – № 12. – C. 1784–1801.
- 145.Liu, L. Regulation of carotenoid metabolism in tomato / L. Liu, Z. Shao, M. Zhang, Q. Wang // *Molecular plant*. – 2015. – T. 8. – № 1. – C. 28–39.
- 146.Llorente B. Regulation of carotenoid biosynthesis in photosynthetic organs / B. Llorente // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2016. – T. 79. – C. 141-160.
- 147.Llorente, B. Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism / B. Llorente, L. D'Andrea, M. A. Ruiz-Sola, E. Botterweg, P. Pulido, J. Andilla, P. Loza-Alvarez, M. Rodriguez-Concepcion // *Plant Journal*. – 2016. – T. 81. – № 1. – C. 107-119.
- 148.López-Emparán, A. Functional analysis of the *Brassica napus* L. phytoene synthase (*PSY*) gene family / A. López-Emparán, D. Quezada-Martinez, M. Zúñiga-Bustos, V. Cifuentes, F. Iñiguez-Luy, M. L. Federico // *PLoS ONE*. – 2014. – T. 9. – № 12.
- 149.López-Ráez, J. A. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? / J. A. López-Ráez, W. Kohlen, T., Charnikhova, P., Mulder, A. K. Undas, M. J. Sergeant, F. Verstappen, T. D. H. Bugg, A. J. Thompson, C. Ruyter-Spira, H. Bouwmeester // *The new phytologist*. – 2010. – T. 187. – № 2. – C. 343–354.
- 150.Ludwiczuk, A. Terpenoids / A. Ludwiczuk, K. Skalicka-Woźniak, M. I. Georgiev // *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. – 2017. – C. 233-266.
- 151.Liu, L. MIT1, encoding a 15-cis- $\zeta$ -carotene isomerase, regulates tiller number and stature in rice / L. Liu, M. Ren, P. Peng // *Journal of Genetics and Genomics*. – 2021. – T. 48. – № 1. – C.88–91.
- 152.Ma, G. Enzymatic formation of  $\beta$ -citraurin from  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin by carotenoid cleavage dioxygenase4 in the flavedo of citrus fruit / G. Ma, L. Zhang, A. Matsuta Yamawaki K, Yahata M, Wahyudi A, Motohashi R, Kato M // *Plant Physiology*. – 2013. – T. 163. – № 2. – C. 682-695.
- 153.Ma, G. Expression and functional analysis of citrus carotene hydroxylases: Unravelling the xanthophyll biosynthesis in citrus fruits / G. Ma, L. Zhang, W. Yungyuen Tsukamoto I, Iijima N, Oikawa M, Yamawaki K, Yahata M, Kato M // *BMC Plant Biology*. – 2016. – T. 16. – № 1.
- 154.Viuda-Martos, M. Identification of flavonoid content and chemical composition of the essential oils of Moroccan herbs: myrtle (*Myrtus communis* L.), rockrose (*Cistus*

- ladanifer* L.) and montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.) / M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López, M. Amensour, J. Abrini // Journal of Essential Oil Research. – 2011. – T. 23. – № 2. – C. 1-9.
155. Mapelli-Brahm, P. The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: sources, consumption, bioavailability and health effects / P. Mapelli-Brahm, A. Meléndez-Martínez, J. Antonio // Current Opinion in Food Science. – 2021. – T. 41.
156. Martínez-Andújar, C. Impact of overexpression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase on growth and gene expression under salinity stress / C. Martínez-Andújar, A. Martínez-Pérez, A. Ferrández-Ayela, A. Albacete, P. A. Martínez-Melgarejo, I. C. Dodd, A. J. Thompson, J. M. Pérez-Pérez, F. Pérez-Alfocea // Plant science : an international journal of experimental plant biology. – 2020. – № 295.
157. Mascone, E. A. The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): A cytogenetic perspective / E. A. Moscone, M. A. Scaldaferrro, M. Grabielle // Acta Horticulturae. – 2007. – T. 745. – C. 137-169.
158. Matsumoto, H. Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties / H. Matsumoto, Y. Ikoma, M. Kato, T. Kuniga, N. Nakajima, T. Yoshida // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – T. 55. – № 6.
159. Meléndez-Martínez, A. J. CHAPTER 1: Structures, nomenclature and general chemistry of carotenoids and their esters / A. J. Meléndez-Martínez, P. Mapelli-Brahm, D. Hornero-Méndez, I. M. Vicario // Food Chemistry, Function and Analysis. – 2019. – C. 3-50.
160. Meléndez-Martínez, A. J. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to in vitro antioxidant activity / A. J. Meléndez-Martínez, P. D. Fraser, P. M. Bramley // Phytochemistry. – 2010. – T. 71. – № 10. – C. 1104-1114.
161. Mialoundama, A. S. Characterization of plant carotenoid cyclases as members of the flavoprotein family functioning with no net redox change / A. S. Mialoundama, D. Heintz, N. Jadid, P. Nkeng, A. Rahier, J. Deli, B. Camara, F. Bouvier // Plant Physiology. – 2010. – T. 153. – № 3. – C. 970-979.
162. Mittler, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination / R. Mittler // Trends in Plant Science. – 2006. – T. 11. – № 1. – C. 15-19.
163. Muñoz-Espinoza, V. A. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions / V. A.

- Muñoz-Espinoza, M. F. López-Climent, J. A. Casaretto, A. Gómez-Cadenas // *Frontiers in plant science*. – 2015. – T. 6. – № 997.
164. Muñoz, P. Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function / P. Muñoz, S. Munné-Bosch // *Trends in Plant Science*. – 2019. – T. 24. – № 11. – C.1040–1051.
165. Moreno, J. C. Expression of a carotenogenic gene allows faster biomass production by redesigning plant architecture and improving photosynthetic efficiency in tobacco / J. C. Moreno, J. Mi, S. Agrawal, S. Kossler, V. Tureckova, D. Tarkowska, W. Thiele, S. Al-Babili, R. Bock, M. A. Schottler // *The Plant Journal*. – 2020. – T. 103. – C. 1967-1984.
166. Nisar, N. Carotenoid metabolism in plants / N. Nisar, L. Li, S. Lu, N. C. Khin, B. J. Pogson // *Molecular Plant*. – 2015. – T. 8. – № 1. – C. 68-82.
167. Nowicka, B. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones / B. Nowicka, J. Kru // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. – 2010. – T. 1797. – № 9. – C. 1587–1605.
168. Ohmiya, A. Diversity of carotenoid composition in flower petals / A. Ohmiya // – 2011.
169. Orlovskaya, O. A. Association of total carotenoid level in maize grain (*Zea mays* L.) with polymorphic site InDel1 in PSY1 gene / O. A. Orlovskaya, S. I. Vakula, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky // *Ecological genetics*. – 2016. – T. 14. – № 3. – C. 28-34.
170. Osorio, C. E. The role of *Orange* Gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future // *Front. Plant Sci*. – 2019. – T. 10.
171. Pandita, D. Secondary metabolites in medicinal and aromatic plants (MAPs): Potent molecules in nature's arsenal to fight human diseases / D. Pandita, A. Pandita // *Medicinal and Aromatic Plants*. – 2021. – C. 41-84.
172. Paran, I. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper / I. Paaran, E van der Knaap // *Journal of experimental botany*. – 2007. – T. 58. – № 14. – C. 3841–3852.
173. Paparella, A.  $\beta$ -Ionone: Its occurrence and biological function and metabolic engineering / A. Paparella, L. Shaltiel-Harpaza, M. Ibdah // *Plants*. – 2021. – T. 10. – № 4.
174. Park, H. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis / H. Park, S. S. Kreunen, A. J. Cuttriss, D. DellaPenna, B. J. Pogson // *The Plant cell*. – T. 14. – № 2. – C. 321–332.
175. Pasaresi, P. Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening / P. Pasaresi, C. Mizzotti, M. Colombo, S. Masiero // *Frontiers in plant science* – 2014. – T. 5. – № 124.

176. Peralta, I. E. Phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*) / I. E. Peralta, D. M. Spooner // *Amer. J. Bot.* – 2001. – T. 88. – № 10. – C. 1888-1902.
177. Peralta, I.E. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicum*: Solanaceae) from northern Peru / I. E. Peralta, D.M. Spooner, S. Knapp // *Systematic Botany* – 2005. – T. 30. – № 2. – C. 424–434.
178. Peralta, I. E. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae) / I. E. Peralta, D. M., Spooner, S. Knapp // *Systematic Botany Monographs*. – 2008. – T. 84. – C. 1–186.
179. Pereira da Costa, J. H. Genome-wide expression analysis at three fruit ripening stages for tomato genotypes differing in fruit shelf life / J. H. Pereira da Costa, G. R. Rodríguez, L. A. Picardi Liliana Amelia; Zorzoli, Roxana; Pratta, Guillermo Raúl // *Scientia Horticulturae*. – 2018. – T. 229. – № 2. – C. 125–131.
180. Pinheiro, T. T. Citrus carotenoid isomerase gene characterization by complementation of the “Micro-Tom” tangerine mutant / T. T. Pinheiro, L. E. P. Peres, E. Purgatto, R. R. Latado, R. A. Maniero, M. M. Martins, A. Figueira // *Plant Cell Reports*. – 2019. – T. 38. – № 5. – C. 623-636.
181. Pizarro, L. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants / L. Pizarro, C. Stange // *Ciencia E Investigacion Agraria*. – 2009. – № 36. – C. 143–162.
182. Pollastri, S. Isoprene: An antioxidant itself or a molecule with multiple regulatory functions in plants? / S. Pollastri, I. Baccelli, F. Loret // *Antioxidants*. – 2021. – T. 10. – № 5.
183. Qin, X. Expression, subcellular localization, and cis-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.) / X. Qin, A. Coku, K. Inoue, L. Tian // *Planta*. – 2011. – T. 234. – № 4. – C. 737-748.
184. Quian-Ulloa, R. Carotenoid biosynthesis and plastid development in plants: The role of light / R. Quian-Ulloa, C. Stange // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – T. 22. – № 3.
185. Rappor, L. Fruit ripening: dynamics and integrated analysis of carotenoids and anthocyanins / L. Kapoor, A. J. Simkin, C. George Priya Doss, R. Siva // *BMC plant biology*. – 2022. – T. 22. – № 1.
186. Ray, J. Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato / J. Ray, P. Moureau, C. Bird, A. Bird, D. Grierson, M. Maunder, M. Truesdale, P. Bramley, W. Schuch // *Plant molecular biology*. – 1992. – T. 19. – № 3. – C.401–404.

187. Razifard, H. Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America / A. Ramos, V. A. Della, C. Bodary, E. Goetz E // *Molecular Biology and Evolution* Volume – 2020. – T. 37. – № 4. – C.1118–1132.
188. Razungles, A. Determination of Carotenoids in Fruits of *Rosa* sp. (*Rosa Canina* and *Rosa Rugosa*) and of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) / A. Razungles, J. Oszmianski, J. -c sapis // *Journal of Food Science*. – 1989. – T. 54. – № 3.
189. Rick, C. M. A revised key for the *Lycopersicon* species / C. M. Rick, H. Laterrot, J. Philouze // *Tomato Genet. Coop. Rep.* –1990. – T. 40. – № 31.
190. Rodrigo, M. J. A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of Citrus fruit-specific apocarotenoid pigments / M. J. Rodrigo, B. Alquézar, E. Alós, V. Medina, L. Carmona, M. Bruno, S. Al-Babili, L. Zacarías // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – T. 64. – № 14. – C. 4461-4478.
191. Rodrigo, M. J. A mutant allele of  $\zeta$ -carotene isomerase (*Z-ISO*) is associated with the yellow pigmentation of the "Pinalate" sweet orange mutant and reveals new insights into its role in fruit carotenogenesis / M. J. Rodrigo, J. Lado, E. Alós, B. Alquézar, O. Dery, J. Hirschberg, L. Zacarías // *BMC plant biology*. – 2019. – T. 19. – № 1.
192. Rodriguez, F. Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? / F. Rodriguez, F. Wu, C. Ané // *BMC Evol Biol.* – 2009. – T. 9. – № 191.
193. Rodriguez-Amaya, D. B. Structures and analysis of carotenoid molecules / D. B. Rodriguez-Amaya // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2016. – T. 79. – C. 71-108.
194. Rodriguez-Concepcion, M. Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light / M. Rodriguez-Concepcion, C. Stange // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2013. – T. 539. – № 2.
195. Rodríguez-Concepción, M. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics / M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat // *Plant physiology* – 2002. – T. 130. – № 3. – C. 1079-1089.
196. Rodríguez-Concepción, M. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants / M. Rodríguez-Concepción // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2010. – T. 504. – № 1. – C. 118-122.
197. Rodríguez-Suárez, C. Allelic variation, alternative splicing and expression analysis of *PSY1* gene in *Hordeum chilense* Roem / C. Rodríguez-Suárez, S. G. Atienza, F. Pistón // *PLoS ONE*. – 2011. – T. 6. – № 5. – C. 1-10.

198. Rodríguez-Villalón, A. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings / A. Rodríguez-Villalón, E. Gas, M. Rodríguez-Concepción // *Plant Journal*. – 2009. – T. 60. – № 3. – C. 424-435.
199. Römer, S., Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum* / S. Römer, P. Hugueney, F. Bouvier, B. Camara, M. Kuntz // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1993. – T. 196. – № 3. – C. 1414–1421.
200. Ronen, G. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato / G. Ronen, L. Carmel-Goren, D. Zamir, J. Hirschberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – T. 97. – № 20. – C.11102–11107.
201. Ruiz-Sola, M. Á. Carotenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*: A Colorful Pathway / M. Á. Ruiz-Sola, M. Rodríguez-Concepción // *The Arabidopsis Book*. – 2012. – T. 10.
202. Ruiz-Sola, M. Á. A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis* / M. Á. Ruiz-Sola, V. Arbona, A. Gómez-Cadenas, M. Rodríguez-Concepción, A. A. Rodríguez-Villalón // *PLoS ONE*. – 2014. – T. 9. – № 3.
203. Saini, R. K. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities / R. K. Saini, S. H. Nile, S. W. Park // *Food research international*. – 2015. – T. 76. – № 3. – C. 735-750.
204. Sakakibara, H. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation / H. Sakakibara // *Annual review of plant biology*. – 2006. – T. 57. – C. 431-449.
205. Särkinen, T. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (*Solanaceae*): a dated 1000-tip tree / T. A. Särkinen, L. Bohs, R. G. Olmstead, S. Knapp // *BMC evolutionary biology* – 2013. – T. 3. – № 1.
206. Sathasivam, R. Molecular characterization, expression analysis of carotenoid, xanthophyll, apocarotenoid pathway genes, and carotenoid and xanthophyll accumulation in *Chelidonium majus* L / R. Sathasivam, H. J. Yeo, C. H. Park, M. Choi, H. Kwon, J. E. Sim, S. U. Park, J. K. Kim // *Plants*. – 2021. – T. 10. – № 8.
207. Sato, S. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution / S. Sato, S. Tabata, H. Hirakawa // *Nature*. – 2012. – T. 485. – № 7400. – C. 635-641.
208. Serra S. Recent advances in the synthesis of carotenoid-derived flavours and fragrances / S. Serra // *Molecules*. – 2015. – T. 20. – № 7. – C. 12817-12840.

209. Sharkey, T. D. Isoprene emission from plants: Why and how / T. D. Sharkey, A. E. Wiberley, A. R. Donohue // *Annals of botany*. – 2008. – T. 101. – № 1. – C. 5-18.
210. Sharkey, T. D. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves / T. D. Sharkey, X. Chen, S. Yeh // *Plant Physiology*. – 2001. – T. 125. – № 4. – C. 2001-2006.
211. Shao, Y. *Phytoene Synthase* gene (*PSY*) from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) enhances tolerance to abiotic stress / H. Shao, B. Yong, P. Xu // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2018. – T. 61.
212. Shinozaki, Y. High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening / Y. Shinozaki, P. Nicolas, N. Fernandez-Pozo // *Nature Communications*. – 2018. – T. 9. – № 1.
213. Shumskaya, M. The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions / M. Shumskaya, E. T. Wurtzel // *Plant science: an international journal of experimental plant biology*. – 2013. – T. 208. – № 2. – C. 58-63.
214. Shumskaya, M. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity / M. Shumskaya, L. M. T. Bradbury, R. R. Monaco, E. T. Wurtzel // *Plant Cell*. – 2012. – T. 24. – № 9. – C. 3725-3741.
215. Simkin, A. J. Carotenoids and apocarotenoids in planta: Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits / A. J. Simkin // *Plants*. – 2021. – T. 10. – № 11.
216. Stanley, L. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus / L. Stanley, Y. W. Yuan // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – T. 10.
217. Stauder, R. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *phytoene synthase* gene family / R. Stauder, R. Welsch, M. Camagna, W. Kohlen, G. U. Balcke, A. Tissier, M. H. Walter // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – T. 9.
218. Su, L. Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance / L. Su, G. Diretto, E. Purgatto, S. Danoun, M. Zouine, Z. Li, J. P. Roustan, M. Bouzayen, G. Giuliano, C. Chervin // *BMC plant biology*. – 2015. – T. 15. – № 144.
219. Sun, T. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives / T. Sun, S. Rao, X. Zhou, L. Li // *Molecular Horticulture*. – 2022. – T. 2. – № 1.
220. Sun, B. Color-related chlorophyll and carotenoid concentrations of Chinese kale can be altered through CRISPR/Cas9 targeted editing of the carotenoid isomerase gene

- BoaCRTISO* / B. Sun, M. Jiang, H. Zheng, Y. Jian, W-L. Huang, Q. Yuan, A-H. Zheng, Q. Chen, Y-T. Zhang, Y-X. Lin, Y. Wang, X-R Wang, Q-M. Wang, F. Zhang, H-R. Tan // *Horticulture Research*. – 2020. – T. 7. – № 1.
221. Sun, L. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *SINCE1* increases both lycopene and  $\beta$ -carotene contents in tomato fruit / L. Sun, B. Yuan, M. Zhang, L. Wang, M. Cui, Q. Wang, & P. Leng // *Journal of experimental botany* – 2012. – T. 63. – № 8. – C. 3097-3108.
222. Sugiyama, A. Allelic diversity of phytoene synthase gene influences the transcription level in citrus fruit among a citrus F1 hybrid population / A. Sugiyama, Y. Ikoma, H. Fujii, T. Endo, H. Nesumi, T. Shimada, M. Omura // *Breeding Science*. – 2017. – T. 67. – № 4. – C. 382-392.
223. Swapnil, P. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects / P. Swapnil, M. Meena, S. K. Singh, U. P. Dhuldhaj, Harish, A. Marwal // *Current Plant Biology* – 2021. – T. 26.
224. Tan, B. C. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family / B. C. Tan, L. M. Joseph, W. T. Deng, L. Liu, Q. B. Li, K. Cline, D. R. McCarty // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. – 2003. – T. 35. – № 1. – C. 44–56.
225. Tang, D. Fruit development and epigenetic modifications / D. Tang, P. Gallusci, Z. Lang // *The New phytologist*. – 2020. – T. 228. – № 3. – C. 839–844.
226. Tang, J. Integrated transcriptomics and metabolomics analyses reveal the molecular mechanisms of red-light on carotenoids biosynthesis in tomato fruit / J. Tang, Y. Li, Z. Liu // *Food Quality and Safety*. – 2022. – T. 6.
227. Tanksley, S. D. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild / S. D. Tanksley, S. R. McCouch // *Science*. – 1997. – T. 277. – № 5329. – C. 1063–1066.
228. Taylor, I. B. Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors / I. B. Taylor, T. Sonneveld, T. D. H. Bugg, A. J. Thompson // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2015. – T. 2. – № 4. – C. 105–113.
229. Thirumurugan, D. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites / D. Thirumurugan, A. Cholarajan, S. S. S. Raja, R. Vijayakumar // *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. – 2018.
230. Tholl, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants / D. Tholl // *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. – 2015. – T. 148. – C. 63-106.

231. Tracewell, C. A. Carotenoid photooxidation in photosystem II / C. A. Tracewell, J. S. Vrettos, J. A. Bautista, H. A. Frank, G. W. Brudvig, // Archives of biochemistry and biophysics. – 2001. – T. 385. – № 1. – C. 61–69.
232. Toledo-Ortiz, G., The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription / G. Toledo-Ortiz, H. Johansson, K. P. Lee, J. Bou-Torrent, K. Stewart, G. Steel, M. Rodríguez-Concepción, K. J. Halliday // PLoS genetics. – 2014. – T. 10. – № 6.
233. Toledo-Ortiz, G. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors / G. Toledo-Ortiz, E. Huq, M. Rodríguez-Concepción // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – T. 107. – № 25. – C. 11626–11631.
234. Verma, N. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites / N. Verma, S. Shukla // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. – 2015. – T. 2. – № 4. – C. 105–113.
235. Walter, M. H. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions / M. H. Walter, D. Strack // Natural Product Reports. – 2011. – T. 28. – № 4. – C. 663-692.
236. Walter, M. H. Evolution of root-specific carotenoid precursor pathways for apocarotenoid signal biogenesis / M. H. Walter, R. Stauder, A. Tissier // Plant Science. – 2015. – T. 233 – C. 1-10.
237. Wang, Y. Q. Proteomic analysis of chromoplasts from six crop species reveals insights into chromoplast function and development / Y. Q. Wang, Y. Yang, Z. Fei, H. Yuan, T. Fish, T. W. Thannhauser, M. Mazourek, L. V. Kochian, X. Wang, & L. Li // Journal of Experimental Botany. – 2013. – T. 64. – № 4. – C. 949-961.
238. Wang, P. Double NCED isozymes control ABA biosynthesis for ripening and senescent regulation in peach fruits / P. Wang, S. Lu, X. Zhang, B. Hyden, L. Qin, L. Liu, Y. Bai, Y. Han, Z. Wen, J. Xu, H. Cao, H. Chen // Plant science : an international journal of experimental plant biology. – 2021. – № 304.
239. Wang, Z. Characterization and functional analysis of phytoene synthase gene family in tobacco / Z. Wang, L. Zhang, C. Dong, J. Guo, L. Jin, P. Wei, F. Li, X. Zhang, R. Wang // BMC plant biology. – 2021. – T. 21. – № 1.
240. Wegener, C. B. Cultivated and wild *Solanum* species as potential sources for health-promoting quality traits / C. B. Wegener, G. Jansen // Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation. – 2011. – T. 9. – № 2.

241. Wei, J. The role of carotenoid isomerase in maintenance of photosynthetic oxygen evolution in rice plant / J. Wei, M. Xu, D. Zhang, H. Mi // *Acta biochimica et biophysica Sinica*. – 2010. – T. 42. – № 7. – C. 457–463.
242. Welsch, R. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes / R. Welsch, F. Wüst, C. Bär, S. Al-Babili, P. A. Beyer // *Plant Physiology*. – 2008. – T. 147. – № 1. – C. 367-380.
243. Wu, H. Identification and expression analysis of strigolactone biosynthetic and signaling genes reveal strigolactones are involved in fruit development of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) / H. Wu, H. Li, H. Chen, Q. Qi, Q. Ding, J. Xue, J. Ding, X. Jiang, X. Hou, Y. Li // *BMC plant biology*. – 2010. – T. 19. – № 1.
244. Xu, X. Combined analysis of carotenoid metabolites and the transcriptome to reveal the molecular mechanism underlying fruit colouration in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) / X. Xu, X. Lu, Z. Tang, X. Zhang, F. Lei, L. Hou, M. Li // *Food Chemistry: Molecular Sciences*. – 2021. – T. 2.
245. Yang, R. Hormone profiling and transcription analysis reveal a major role of ABA in tomato salt tolerance / R. Yang, T. Yang, H. Zhang, Y. Qi, Y. Xing, N. Zhang, R. Li, S. M. Weeda, S. Ren, B. Ouyang, Y. Guo // *Plant physiology and biochemistry*. – 2014. – № 77. – C. 23-34.
246. Yazdani, M. Ectopic expression of *ORANGE* promotes carotenoid accumulation and fruit development in tomato / M. Yazdani, Z. Sun, H. Yuan // *Plant Biotechnology Journal*. – 2019. – T. 17. – № 1. – C. 33-49.
247. Yoo, H. J. Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid profiling / H. J. Yoo, W. J. Park, G. M. Lee, C. S. Oh, I. Yeam, D. C. Won, C. K. Kim, & J. M. Lee // *Molecules*. – 2017. – T. 22. – № 5.
248. Ytterberg, A. J. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes / A. J. Ytterberg, J. B. Peltier, K. J. Van Wijk // *Plant Physiology*. – 2006. – T. 140. – № 3. – C. 984-997.
249. Yu, Q. Plant Carotene Cis-Trans Isomerase CRTISO / Q. Yu, S. Ghisla, J. Hirschberg, V. Mann, P. Beyer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286. – № 10. – C. 8666–8676.
250. Zhang, L. Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro / L. Zhang, G. Ma, M. Kato, K. Yamawaki, T.

- Takagi, Y. Kiriwa, Y. Ikoma, H. Matsumoto, T. Yoshioka, & H. Nesumi // *Journal of Experimental Botany*. – 2012. – T. 63. – № 2. – C. 871-886.
251. Zhang, M. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits / M. Zhang, P. Leng, G. Zhang, X. Li // *Journal of plant physiology*. – 2009. – T. 166. – № 12. – C.1241–1252.
252. Zhang, W. Association between allelic variation at the *Phytoene synthase 1* gene and yellow pigment content in the wheat grain / W. Zhang, J. Dubcovsky // *Theor Appl Genet*. – 2008. – № 116. – C.635–645.
253. Zhu, C. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers / C. Zhu, C. Bai, G. Sanahuja, D. Yuan, G. Farré, S. Naqvi, L. Shi, T. Capell, P. Christou // *Arch Biochem Biophys*. – 2010. – T. 504. – №1. – C. 132-141.
254. Zhu, Z. Overexpression of *SIPRE2*, an atypical bHLH transcription factor, affects plant morphology and fruit pigment accumulation in tomato / Z. Zhu, G. Chen, X. Guo, W. Yin, X. Yu, J. Hu, & Z. Hu // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – № 1.
255. Zuo, Z. Isoprene acts as a signaling molecule in gene networks important for stress responses and plant growth / Z. Zuo, S. M. Weraduwage, A. T. Lantz, L. M. Sanchez, S. E. Weise, J. Wang, K. L. Childs & T. D. Sharkey // *Plant Physiology*. – 2019. – T. 180. – № 1. – C. 124-152.