

Структурно-функциональные особенности изоформ фитохинсинтазы PSY1 и PSY2 у сортов перца *Capsicum annuum* L.

Е.А. Дьяченко¹, М.А. Филюшин¹✉, Г.И. Ефремов¹, Е.А. Джос^{1,2}, А.В. Щенникова¹, Е.З. Кочиева¹

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Московская область, Россия

✉ e-mail: michel7753@mail.ru

Аннотация. Плоды сортов перца характеризуются различной окраской, которая определяется соотношением пигментов, при этом в спелых плодах доминируют каротиноиды, тогда как в незрелых – хлорофиллы (иногда вместе с антоцианами). Ключевым регулятором биосинтеза каротиноидов является фитохинсинтаза, кодируемая геном *PSY*. Геном перца *Capsicum annuum* содержит два гена, кодирующих фитохинсинтазы, одна из которых локализуется преимущественно в пластидах листа (*PSY2*), другая – в пластидах плода (*PSY1*). В данной работе были идентифицированы полногеномные последовательности *PSY1* и *PSY2* у девяти сортов *C. annuum*, различающихся окраской спелого плода. Вариабельность последовательностей составила 2.43 % (69 SNP) и 1.21 % (36 SNP). Наиболее вариабельны белки *PSY1* сортов Мария (красный плод) и Сладкий шоколад (красно-коричневый плод). В последовательностях *PSY1* и *PSY2* определены фитохинсинтазный домен HH-IPPS и транзитный пептид. Идентифицированы функционально значимые участки в домене HH-IPPS *PSY1* и *PSY2* анализируемой выборки сортов перца. Для исследуемых образцов области, ограничивающие активные сайты (YAKTF и RAYV), аспаратат-богатые субстрат-Mg²⁺-связывающие сайты (DELVD и DVGED) и другие функциональные сайты, консервативны. Транзитные пептиды были более вариабельны, их сходство у белков *PSY1* и *PSY2* не превышало 78.68 %. Биохимический анализ показал, что наибольшие количества хлорофиллов и каротиноидов среди исследуемой выборки содержатся в незрелых и спелых плодах сортов Сладкий шоколад и Шоколадный. Значительным содержанием хлорофиллов, но минимальным – каротиноидов отличались спелые плоды сорта Несозревающий (зеленый плод). Профиль экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* был определен в перикарпе плода на трех стадиях созревания у сортов Желтый букет, Сладкий шоколад, Кармин и Несозревающий, контрастных по окраске спелого плода – желтой, коричневой, темно-красной и зеленой соответственно. В листьях исследуемых сортов уровни экспрессии *PSY1* значительно варьировали. Для всех сортов был характерен рост транскрипции гена *PSY1* по мере созревания плода, при этом в зрелом плоде максимальный уровень транскрипции выявлен у сорта Сладкий шоколад, а самый низкий – у сорта Несозревающий. Транскрипты *PSY2* были выявлены не только в листе и незрелом плоде, но и в спелых плодах. Оценка возможной корреляции транскрипции *PSY1* и *PSY2* с суммарным содержанием каротиноидов и хлорофиллов показала, что имеется прямая зависимость между уровнем экспрессии гена *PSY1* и каротиноидной пигментацией плода в процессе созревания. Высказано предположение, что у сорта Несозревающий отсутствие типичного для плодов перца паттерна пигментации перикарпа в процессе созревания может быть связано с нарушениями образования хромoplastов. Ключевые слова: каротиногенез; *Capsicum annuum*; плоды перца; созревание плодов; окраска плода.

Для цитирования: Дьяченко Е.А., Филюшин М.А., Ефремов Г.И., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Структурно-функциональные особенности изоформ фитохинсинтазы *PSY1* и *PSY2* у сортов перца *Capsicum annuum* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(7):687-696. DOI 10.18699/VJ20.663

Structural and functional features of phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in pepper *Capsicum annuum* L. cultivars

Е.А. Dyachenko¹, М.А. Filyushin¹✉, G.I. Efremov¹, E.A. Dzhos^{1,2}, A.V. Shchennikova¹, E.Z. Kochieva¹

¹ Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Federal Scientific Vegetable Center, VNISSOK village, Moscow region, Russia

✉ e-mail: michel7753@mail.ru

Abstract. The fruits of various pepper cultivars are characterized by a different colour, which is determined by the pigment ratio; carotenoids dominate in ripe fruits, while chlorophylls, in immature fruits. A key regulator of carotenoid biosynthesis is the phytoene synthase encoded by the *PSY* gene. The *Capsicum annuum* genome contains two isoforms of this enzyme, localized in leaf (*PSY2*) and fruit (*PSY1*) plastids. In this work, the complete *PSY1* and *PSY2* genes were identified in nine *C. annuum* cultivars, which differ in ripe fruit colour. *PSY1* and *PSY2* sequence variability was 2.43 % (69 SNPs) and 1.21 % (36 SNPs). The most variable were *PSY1* proteins of the cultivars 'Maria' (red-fruited) and 'Sladkij shokolad' (red-brown-fruited). All identified *PSY1* and *PSY2* homologs contained the phytoene synthase domain HH-IPPS and the transit peptide. In the *PSY1* and *PSY2* HH-IPPS domains, functionally significant sites were

determined. For all accessions studied, the active sites (YAKTF and RAYV), aspartate-rich substrate-Mg²⁺-binding sites (DELVD and DVGED), and other functional residues were shown to be conserved. Transit peptides were more variable, and their similarity in the PSY1 and PSY2 proteins did not exceed 78.68 %. According to the biochemical data obtained, the largest amounts of chlorophylls and carotenoids across the cultivars studied were detected in immature and ripe fruits of the cv. 'Sladkij shokolad' and 'Shokoladnyj'. Also, ripe fruits of the cv. 'Nesozrevayuschij' (green-fruited) were marked by significant chlorophyll content, but a minimum of carotenoids. The PSY1 and PSY2 expression patterns were determined in the fruit pericarp at three ripening stages in 'Zhelytyj buket', 'Sladkij shokolad', 'Karmin' and 'Nesozrevayuschij', which have different ripe fruit colours: yellow, red-brown, dark red and green, respectively. In the leaves of the cultivars studied, PSY1 expression levels varied significantly. All cultivars were characterized by increased PSY1 transcription as the fruit ripened; the maximum transcription level was found in the ripe fruit of 'Sladkij shokolad', and the lowest, in 'Nesozrevayuschij'. PSY2 transcripts were detected not only in the leaves and immature fruits, but also in ripe fruits. Assessment of a possible correlation of PSY1 and PSY2 transcription with carotenoid and chlorophyll content revealed a direct relationship between PSY1 expression level and carotenoid pigmentation during fruit ripening. It has been suggested that the absence of a typical pericarp pigmentation pattern in 'Nesozrevayuschij' may be associated with impaired chromoplast formation.

Key words: carotenogenesis; *Capsicum annuum*; pepper fruits; fruit ripening; fruit pigmentation.

For citation: Dyachenko E.A., Filyushin M.A., Efremov G.I., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Structural and functional features of phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in pepper *Capsicum annuum* L. cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):687-696. DOI 10.18699/VJ20.663

Введение

Род *Capsicum* включает, по разным оценкам, 30–35 видов, пять из которых domestцированы: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* и *C. baccatum* (Moscone et al., 2007; Dias et al., 2013). Плоды перцев, как сладкие, так и острые (чили), имеют высокую диетическую ценность; они богаты антиоксидантами, в том числе витамином С, флавоноидами и каротиноидами (Sun et al., 2007; Cervantes-Paz et al., 2014).

Известно, что приматы, включая человека, не синтезируют каротиноиды *de novo*, однако остро нуждаются в них, поскольку, например, β- и α-каротин являются предшественниками витамина А. Антиоксидантная активность каротиноидов, содержащихся в каротиногенных фруктах и овощах, помогает снизить риск возникновения различных заболеваний, таких как некоторые виды рака, возрастные патологии органов зрения и сердечно-сосудистые заболевания (Howard et al., 2000; Story et al., 2010; Giuliano, 2017). Среди овощных культур перец, сочные плоды которого обогащены различными типами каротиноидов, служит одним из основных источников антиоксидантов в диете человека. В связи с этим создание новых сортов перца – важная задача современной селекции (Berry et al., 2019; Sun, Li, 2020).

Плоды разных видов перца характеризуются различным содержанием антиоксидантов, и во многих селекционных программах применяют естественные вариации для выявления особенностей «экзотического» аллельного разнообразия и доноров конкретных каротиноидных спектров. Однако в настоящее время преимущественно используют близкородственные образцы одного вида, которые часто не имеют сильных фенотипических различий, обычно наблюдаемых при использовании дикорастущих родственников (Berry et al., 2019).

Каротиноиды совместно с хлорофиллами и антоцианами определяют окраску плодов перца. Заметим при этом, что каротиноиды являются доминирующими пигментами в спелых плодах перца, а хлорофиллы (иногда вместе с антоцианами) – в незрелых, растущих плодах. Окраска плода у разных сортов *C. annuum* зависит от соотношения

пигментов, а также от стадии созревания: у незрелых плодов (стадия mature fruit, MF) она зеленая, желтая, белая или фиолетовая, у спелых (стадия ripe fruit, RF) – оранжевая, красная, темно-красная, коричневая и иногда почти черная (Levy et al., 1995; Márkus et al., 1999; Ha et al., 2007). Как правило, сладкий перец собирают на стадии технической спелости (бланжевый плод, стадия intermediate ripe, IR), а острый перец – биологической спелости (RF). Созревание плода перца сопровождается переходом тканей, содержащих хлоропласты, в ткани, содержащие хромопласты. В хромопластах хлорофиллы деградируют, однако продолжается синтез каротиноидов, которые, в отличие от хлорофиллов, способны накапливаться в специализированных глобулярных структурах (Osorio, 2019). Это приводит к снижению содержания хлорофиллов, накоплению каротиноидов и, как следствие, к смене окраски созревающего плода.

В отличие от томата, в зрелых плодах которого основными каротиноидами являются ликопин и β-каротин, в плодах перца каротиногенез идет дальше – до образования ксантофиллов, и спектр каротиноидов в спелых плодах перца представлен мажорными концентрациями красных пигментов – капсантина и капсорубина, а также различными сочетаниями минорных количеств оранжевых и желтых пигментов: β-каротина, β-криптоксантина, лютеина, зеаксантина, антраксантина и виолаксантина (Giuffrida et al., 2013; Mohd Hassan et al., 2019).

Каротиноидные пигменты представляют собой изопреноидные молекулы, полученные в результате цепочки последовательных преобразований универсального предшественника – изопентенилпирофосфата. Несколько реакций преобразуют данное соединение в геранилгеранилпирофосфат (GGPP), две молекулы которого конденсируются «голова к хвосту» под действием фитоинсинтазы, образуя фитоин – предшественник всех каротиноидов (Fraser et al., 2000).

Таким образом, фитоинсинтаза является ключевым регулятором биосинтеза каротиноидов, поставляя основной субстрат – фитоин (Fraser et al., 2000). Данный фермент кодируется геном *PSY*, экспрессия которого находится

под влиянием промежуточных и конечных продуктов пути (Welsch et al., 2003; Kachanovsky et al., 2012; Enfissi et al., 2017). У растений выявлено несколько типов фитоинсинтаз, и фитоинсинтазная активность зависит от типа фермента и его внутриклеточного расположения (Shumskaya et al., 2012). У *Arabidopsis thaliana* был выявлен только один ген *PSY* (Zhou et al., 2015), у томата *Solanum lycopersicum* – три, при этом белковые продукты этих генов имеют различную локализацию: PSY1 – в пластидах плода, PSY2 – в пластидах листа, PSY3 – в пластидах корня (Stauder et al., 2018). У перца *C. annuum* на сегодняшний день известно два гена, кодирующих фитоинсинтазы; одна из них преимущественно локализуется в пластидах листа (PSY2), другая – в пластидах плода (PSY1) (Thorup et al., 2000; Kilcrease et al., 2015). Соответственно, у томата и перца транскрипты *PSY2* в основном присутствуют в фотосинтезирующих зеленых тканях, тогда как *PSY1* – в зрелых плодах у обеих культур и в лепестках у томата (Giorio et al., 2008; Kilcrease et al., 2015; Berry et al., 2019; Филюшин и др., 2020). Тем не менее обе фитоинсинтазы могут транскрибироваться во всех органах растения (Stauder et al., 2018).

Наше исследование сфокусировано на идентификации генов фитоинсинтаз *PSY1* и *PSY2* у сортов перца овощного *C. annuum*, на оценке их межсортовой вариабельности, как структурной, так и функциональной, а также возможных корреляций между экспрессией данных генов и пигментацией плода.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе были использованы образцы девяти сортов перца *C. annuum*: восемь сортов сладкого перца (Несозревающий, Кармин, Шоколадный, Сладкий шоколад, Ратунда, Мария, Гогошары и Желтый букет) и один сорт острого перца (Мечта хозяйки) (табл. 1). Растения выращены в пленочной теплице в Федеральном научном центре овощеводства (ФНЦО, Московская область).

Идентификация полногеномных последовательностей *PSY1* и *PSY2*. Геномную ДНК каждого из анализируемых сортов перца выделяли из свежесобранных, растертых в жидком азоте листьев, согласно (Puchooa, 2004). Полученный препарат в количестве 100 нг использовали в качестве матрицы для амплификации *PSY1* и *PSY2*. Праймеры для амплификации были разработаны ранее на основе доступных в базе данных NCBI полногеномных последовательностей *C. annuum PSY1* (LOC107868281 bifunctional 15-cis-phytoene synthase, chloroplast, Gene ID: 107868281) и *PSY2* (LOC107859651 phytoene synthase 2, chloroplast, Gene ID: 107859651). Амплификацию гена *PSY1* проводили с праймерами CaPSY1F и CaPSY1R (5'-TCAGAATGTCTGTTGCC TTG-3' и 5'-TCCTGATTTTCATGTTCTTGTAGA-3'), *PSY2* – с праймерами CaPSY2F и CaPSY2R (5'-AGC ATGTCTGTGCTTTGTTG-3' и 5'-CTTCATTCATGTC TTTGTYAGTG-3'). Использовали высокоточную полимеразу LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США), амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) и следующие ПЦР-условия:

исходная денатурация (94 °C в течение 10 мин); 36 циклов денатурации (94 °C, 40 с), отжига (56 °C, 40 с) и синтеза (65 °C, 4 мин); финальное достраивание фрагментов (65 °C, 7 мин). Амплификаты ожидаемой длины очищали из агарозного геля с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN, Хильден, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) и секвенировали (2–4 клон для каждого образца) на ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США).

Сравнительный структурный анализ последовательностей *PSY1* и *PSY2*. Выравнивание и анализ полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для сравнительного анализа использовали известные последовательности *C. annuum PSY1* (Gene ID: 107868281) и *PSY2* (Gene ID: 107859651). Консервативные домены в кодируемых белках определяли с помощью ресурсов NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Функциональную значимость замещений аминокислотных остатков (а. о.) предсказывали с использованием программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>). Под радикальными замещениями подразумеваются такие замещения, которые предположительно могут оказывать влияние на фолдинг белка или его функциональность.

Для кластерного филогенетического анализа последовательностей генов *PSY1* и *PSY2*, идентифицированных у сортов перца, использовали полногеномные последовательности *PSY*-генов *C. annuum* cv. Zunla 1 (*PSY1*, NC_029980.1:c205334820-205328571; *PSY2*, NC_029978.1:142877052-142881261) и *C. annuum* cv. Valencia (*PSY1*, GU085273.1). Анализ проводили с помощью метода ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0.

Определение профиля экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* в плодах перца в процессе созревания. Суммарную РНК выделяли (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) из перикарпа плодов на трех стадиях развития (MF, IR и RF). Полученные препараты очищали от примесей ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия), оценивали качественно и количественно (спектрофотометрически и с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле) и использовали для синтеза первой цепи кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США).

Для определения профиля экспрессии *PSY1* и *PSY2* проводили количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), в трех технических повторах с набором «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Праймеры для РВ-ПЦР были разработаны ранее, на основе доступных в базе данных NCBI последовательностей мРНК *C. annuum PSY1* (X68017) и *PSY2* (XM_016704726.1): для *PSY1* – *PSY1-F* и *PSY1-R* (5'-GTGAAGAGACAGCTGAGATCG-3' и 5'-TCTCCGGAGTCATTAGCATCG-3'), для *PSY2* – *PSY2-F* и *PSY2-R* (5'-AAGGAGTCGCAGAACTGAGC-3' и 5'-GTCGTTTCGCTTCAATCTCATCTAA-3') (Филюшин и др., 2020). Для нормализации уровня транскрипции ге-

Таблица 1. Характеристики плодов использованных в работе сортов перца *C. annuum*

Сорт	Происхождение (код в Госсортеестре, при наличии)	Окраска плода			Сумма хлорофиллов, мкг/г сырой массы			Сумма каротиноидов, мкг/г сырой массы		
		Стадии созревания			MF	IR	RF	MF	IR	RF
		MF	IR	RF						
Несозревающий	ФНЦО	3	3	3	43.8	12.3	29.4	14.5	6.8	55.9
Желтый букет	ФНЦО (9553318)	ТЗ	ЖЗ	Ж	83.3	14.9	0	27.3	47.4	107.7
Гогошары	ФНЦО	3	ЗК	К, сегменты 3	18.5	12.6	7.3	6.8	10.2	38.3
Мечта хозяйки (острый)	ФНЦО (8355299)	ТЗ	ЗК	К	42.6	11.2	9.0	13.2	25.3	87.6
Мария	ФНЦО (9809422)	3	К, оттенок 3	К	47.3	7.49	0	18.6	108.7	407.1
Кармин	ФНЦО (8153509)	3	ЗК	ТК	62.6	14.3	0	26.1	133.0	520.2
Сладкий шоколад	ФНЦО	3	Кор	Кор	119.4	90.77	96.53	61.0	173.7	597.0
Шоколадный	ФНЦО	3	Кор	Кор	121.8	–*	130.9	48.5	–*	1009.9
Ратунда**	ФНЦО	ТЗ	ЗК	ТК	–	–	–	–	–	–

Примечание. Плоды перца анализировались на трех стадиях созревания: MF – незрелый зеленый плод финального размера, IR – бланжевая спелость плода, RF – биологическая спелость плода. Окраска плода: 3 – зеленый, ТЗ – темно-зеленый, Ж – желтый, ЖЗ – желто-зеленый, К – красный, ТК – темно-красный, Кор – коричневый, ЗК – зелено-красный.

* В момент сбора растительного материала плодов сорта Шоколадный, соответствующих стадии IR, не было; ** во время сбора материала у сорта отсутствовали плоды на нужных стадиях созревания (по данным разных лет, содержание суммы каротиноидов в плодах этого сорта может превышать таковое у сорта Шоколадный до двух раз).

нов использовали экспрессию референсного гена *Actin7* и праймеры Actin7-F и Actin7-R (5'-CATGTGCTCAGTGGTGGTTC-3' и 5'-TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG-3') (Bemer et al., 2012). Условия РВ-ПЦР: 95 °С в течение 5 мин; 40 циклов (95 °С – 15 с, 62 °С – 50 с). Статистическая обработка результатов выполнена в программе GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

Содержание суммы хлорофиллов и суммы каротиноидов в перикарпе (вместе кожица и мякоть) плодов определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах. Содержание пигментов рассчитывали по формулам (Lichtenthaler, 1987; Solovchenko et al., 2001), в двух биологических и трех технических повторах.

Результаты и обсуждение

Характеристики полногеномных последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* и кодируемых ими белков

Ранее было показано, что вариабельность характеристик последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* может определять окраску плода перца (Сао et al., 2019; Филошин и др., 2020). Поэтому для данного исследования были отобраны девять сортов перца *C. annuum*, различающихся окраской плода по мере его созревания: Несозревающий, Желтый букет, Шоколадный, Сладкий шоколад, Кармин, Ратунда, Мария, Гогошары и Мечта хозяйки (см. табл. 1). Незрелые плоды всех анализируемых сортов имеют зеленую или темно-зеленую окраску, однако динамика изменения окраски по мере созревания у сортов различается. Плоды сорта Несозревающий остаются зелеными до биологической спелости, плоды сорта Желтый букет желто-зеленые на стадии IR и желтые на стадии RF, плоды сортов Сладкий шоколад и Шоколадный красно-коричневые на обеих стадиях, а оставшиеся четыре сорта имеют зелено-

красные плоды на стадии IR и красные/темно-красные на стадии RF (см. табл. 1).

Для каждого из девяти сортов перца были определены полногеномные последовательности генов *PSY1* и *PSY2*, начиная с ATG-кодона (табл. 2). Длина гена *PSY1* составила 2844 п. н. у всех анализируемых сортов. Для сравнения, у *C. annuum* cv. Zunla 1 последовательность *PSY1*, представленная в базе данных NCBI (NCBI Gene ID: 107868281), имеет такой же размер, тогда как у *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (Gene ID: 543988) этот показатель больше (3302 п. н.). Длина гена *PSY2* у исследуемых сортов составила 2985 п. н., за исключением *PSY2* сорта Мечта хозяйки (2994 п. н. за счет 9-нуклеотидной вставки во втором интроне) (см. табл. 2). Последовательность *PSY2* *C. annuum* cv. Zunla 1 (Gene ID: 107859651) также равна 2985 п. н., а *PSY2* *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (Gene ID: 543964) – 3032 п. н. Вариабельность геномных последовательностей *PSY1* и *PSY2* образцов перца составила 2.43 % (69 SNP) и 1.21 % (36 SNP). При этом в экзонах локализовано 16 и 15 SNP соответственно. В сравнении с *PSY1* и *PSY2* *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 *PSY1* и *PSY2* образцов перца имели 1072/128 и 818/100 (ген/экзоны) SNP.

Кодирующая часть генов *PSY1* и *PSY2* состояла из 6 экзонов и у всех исследуемых сортов составила 1260 и 1299 п. н. соответственно (см. табл. 2). Различия в длине кДНК *PSY1* и *PSY2* обусловлены наличием вставок в экзонах I и VI *PSY2*. Большая часть выявленных SNP была сосредоточена в экзоне III *PSY1* (7 SNP, 43.75 % всех экзонных замен) и в экзоне VI *PSY2* (6 SNP, 40.0 %). Экзон II обоих генов оказался инвариабельным и самым консервативным по отношению к *PSY*-генам *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706. Самым полиморфным в сравнении с *PSY*-генами *S. lycopersicum* оказался экзон I обоих генов.

Таблица 2. Характеристики последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* у сортов *C. annuum*

Сорт	Ген	NCBI ID	Длина экзона/интрона, п. н.						Ген, п. н.	кДНК, п. н.	Белок, а. о.
			I	II	III	IV	V	VI			
Желтый букет	<i>PSY1</i>	MT507241	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507250	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Кармин	<i>PSY1</i>	MT507242	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507251	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Мария	<i>PSY1</i>	MT507243	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507252	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Сладкий шоколад	<i>PSY1</i>	MT507244	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507253	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Шоколадный	<i>PSY1</i>	MT507245	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507254	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Несозревающий	<i>PSY1</i>	MT507246	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507255	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Гогошары	<i>PSY1</i>	MT507247	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507256	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Мечта хозяйки (острый)	<i>PSY1</i>	MT507248	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507257	466/101	51/753	173/193	236/219	193/429	180	2994	1299	432
Ратунда	<i>PSY1</i>	MT507249	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507258	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432

Заметим, что поскольку количество анализируемых в нашей работе сортов ограничено девятью образцами, данные о полиморфизме сортов применимы только к анализируемой выборке.

Нуклеотидные последовательности *PSY1* и *PSY2* были транслированы. Предполагаемые белки *PSY1* и *PSY2* всех анализируемых сортов имели размер 419 и 432 а. о. соответственно (см. табл. 2), содержали консервативный фитоинсинтазный домен HH-IPPS (130–412 и 26–310 а. о. согласно UniProtKB и 75–405 и 92–430 а. о. согласно NCBI-CDD) и N-концевой транзитный пептид TP (1–129 и 1–25 а. о. согласно UniProtKB и 1–74 и 1–91 а. о. согласно NCBI-CDD). Сайты расщепления TP во всех возможных случаях были инварианты внутри анализируемой выборки сортов.

В сравнении с *PSY1* и *PSY2* *C. annuum* cv. Zunla 1 и *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706, идентифицированные у сортов перца последовательности *PSY1/PSY2* содержали 9/15 и 46/43 замещения аминокислотных остатков соответственно. В случае *PSY1* из девяти замещений семь были радикальными (r) и только два нейтральными (n), при этом все r-замещения находились в консервативном домене, а два n-замещения – в транзитном пептиде (рис. 1). Замещение пС59Y было характерно для *PSY1* почти всей изучаемой выборки, кроме сорта Сладкий шоколад, а все радикальные замещения оказались сортоспецифичными. Самыми вариабельными были *PSY1* сортов Мария и Сладкий шоколад (см. рис. 1).

В последовательности *PSY2* из 15 замещений аминокислотных остатков радикальными были девять. Фито-

инсинтазы *PSY2* сортов Мечта хозяйки, Гогошары, Ратунда и Шоколадный не имели различий или же содержали пT430A. У каждого из остальных сортов насчитывалось по одному-два радикальных замещения в домене HH-IPPS (см. рис. 1).

Наличие радикальных замещений в последовательностях *PSY1* и *PSY2* анализируемых сортов может влиять на фолдинг зрелых белков фитоинсинтаз, а также на их способность взаимодействовать с белковыми партнерами и осуществлять корректные каталитические функции. Ранее было показано, что последовательности *PSY1* и *PSY2* обладают высоким сходством (Giorio et al., 2008; Cao et al., 2019). Это наблюдение подтвердилось при сравнении идентифицированных *PSY1* и *PSY2* анализируемых сортов *C. annuum*.

Если пользоваться данными UniProtKB по локализации домена, то HH-IPPS содержит 21 вариабельный сайт, специфичный для каждой из групп белков *PSY1* и *PSY2* (см. рис. 1). Также на C-конце домена *PSY1* были выявлены две делеции P422–S427del и L429del. Последовательность домена в белках *PSY1* и *PSY2* была высококонсервативна (92.86 %).

В отличие от домена, последовательность TP оказалась высоковариабельной. В сравнении с TP *PSY2*, TP *PSY1* содержала 29 замещений аминокислотных остатков (21.32 % от выровненной длины). Таким образом, идентичность TP у *PSY1* и *PSY2* исследуемой выборки сортов перца составила 78.68 %, не считая двух вставок (insF31S33 и insG50) и четырех делеций (нумерация по *PSY2*: N12del, D35del, L57-R62del и S64-D65del) в последовательности *PSY1*.

PSY1	14	59	186	210	214	288	320	321	389	PSY2	71	72	117	178	180	191	236	290	309	383	387	393	394	395	430	C	
Zunla 1	V	C	P	A	D	G	G	L	N	T	G	T	T	E	T	V	A	D	K	E	Y	N	N	T			
Maria		Y		D		R	S									D							Y				
Mechta hozyayki		Y																								A	
Gogoshary		Y																									
Karmin		Y																		E		D	N			A	
Ratunda		Y							T																	A	
Zheltyj buket		Y			V								N								R		D	Y	A		
Nesozrevayuschij	F	Y								S	R			G	S												
Sladkiy shokolad			T						K			P						S								A	
Shokoladnyj		Y																									
		TP	HH-IPPS domain								TP?	HH-IPPS domain?													*		
												HH-IPPS domain?													**		

Рис. 1. Аминокислотный полиморфизм последовательностей PSY1 и PSY2 исследуемой выборки сортов перца *C. annuum* в сравнении с *C. annuum* cv. Zunla 1.

Здесь и на рис. 2, 3: образцы сортов *C. annuum*: Zheltyj buket – Желтый букет, Maria – Мария, Nesozrevayuschij – Несозревающий, Ratunda – Ратунда, Shokoladnyj – Шоколадный, Mechta hozyayki – Мечта хозяйки, Karmin – Кармин, Gogoshary – Гогошары, Sladkiy shokolad – Сладкий шоколад.

* По данным UniProtKB, ** по данным NCBI.

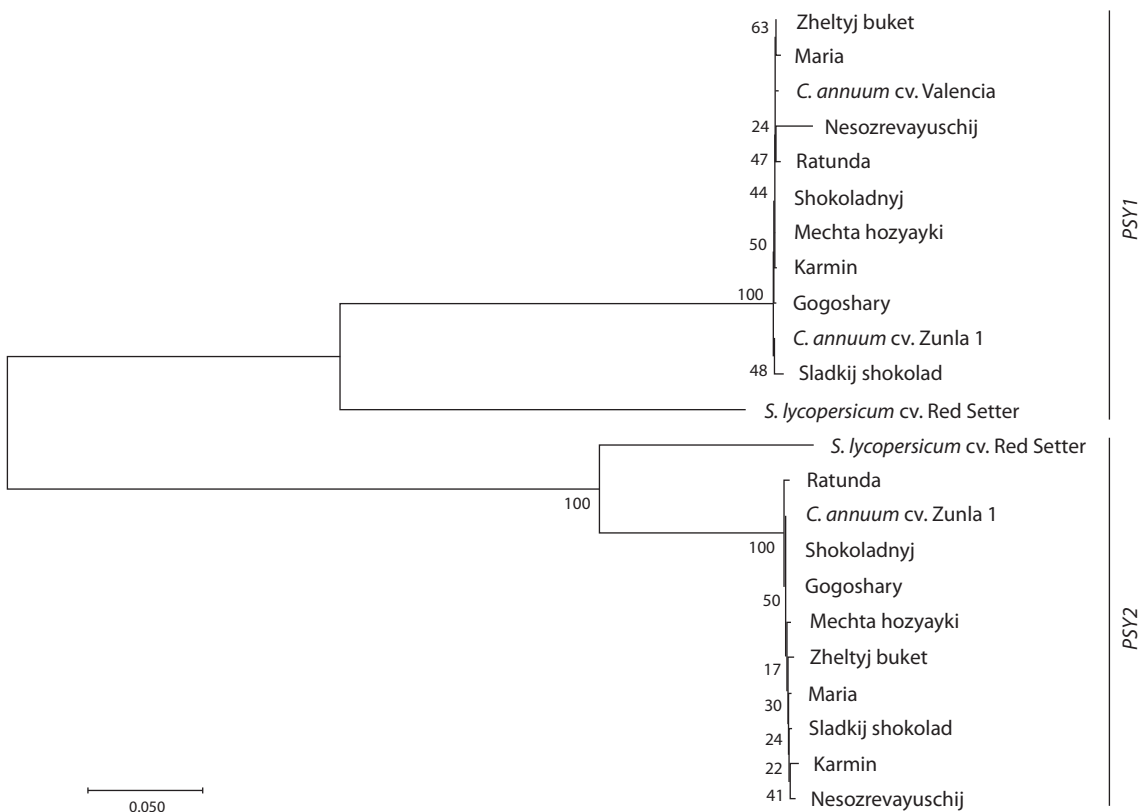


Рис. 2. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей генов PSY1 и PSY2 изучаемых образцов сортов перца *C. annuum*. Дендрограмма построена с помощью MEGA 7.0 (метод ближайших соседей NJ, модель Tamura-Nei, бутстрэп 1000). Для сравнения использованы последовательности PSY1 и PSY2 *Solanum lycopersicum* cv. Red Setter (EF534740.1, EU021055.1).

По-видимому, различия в последовательностях TP могут отвечать за специфичность доставки каждой из фитоинсинтаз в разные типы пластид, как было предположено ранее (Cao et al., 2019).

В последовательностях PSY1 и PSY2 были проведены поиск и оценка функционально значимых участков.

В результате показано, что области, ограничивающие активные сайты (Y₁₄₃AKTF₁₄₇/Y₁₄₉AKTF₁₅₃ и R₃₉₃AYV₃₉₆/R₃₉₉AYV₄₀₂), аспаргат-богатые субстрат-Mg²⁺-связывающие сайты (D₁₇₃ELVD₁₇₇/D₁₇₉ELVD₁₈₃ и D₂₉₉VGED₃₀₃/D₃₀₅VGED₃₀₉), 18 субстрат-связывающих карманов (pockets) и 15 каталитических остатков, консервативны для

исследуемых образцов. Исключение составили замещения gE180G (сорт Несозревающий, PSY2) в сайте DELVD, nD309E (сорт Кармин, PSY2) в сайте DVGED и nG288R (сорт Мария, PSY1, субстрат-связывающий карман). У всех образцов выборки сайты $F_{147}Y_{148}/F_{153}Y_{154}$ и A_{210}/A_{216} были консервативны и для PSY1, и для PSY2, за исключением замены gA210D в последовательности PSY1 сорта Мария. Именно такой состав данных сайтов определяет сходство уровня каротиногенной активности фитоинсинтаз PSY1 и PSY2, при этом, как показано ранее, замещение в сайте A_{210}/A_{216} не является критическим, в отличие от $F_{147}Y_{148}/F_{153}Y_{154}$ (Сао et al., 2019). Поэтому найденное нами радикальное замещение gA210D не должно существенно повлиять на активность PSY1 сорта Мария.

Для подтверждения структурного сходства идентифицированных PSY1 и PSY2 на основе их полногеномных последовательностей был проведен кластерный анализ в сравнении с известными PSY1 и PSY2 *S. lycopersicum* cv. Red Setter и *C. annuum* cv. Zunla 1 (рис. 2). На дендрограмме сорта перца ожидаемо сгруппировались в два больших кластера, объединяющих последовательности PSY1 и PSY2 соответственно (см. рис. 2). Внутри каждого кластера образцы *C. annuum* формировали единый близкородственный субкластер с несущественными внутренними значениями бутстрэпа (17–50) и единственным достоверным объединением сортов Мария и Желтый букет на основании PSY1. Вид *S. lycopersicum* занимал базовую ветвь в каждом из кластеров.

Таким образом, идентифицированные последовательности PSY1 и PSY2 девяти сортов перца, формирующих зрелый плод различной окраски, имеют высокое структурное сходство, что говорит о возможном сохранении ими консервативных ключевых функций фитоинсинтаз в синтезе каротиноидов.

Содержание хлорофиллов и каротиноидов в перикарпе плодов в процессе созревания

Суммарное содержание хлорофиллов и каротиноидов у анализируемых сортов перца было измерено в перикарпе плодов в процессе развития (см. табл. 1). Показано, что незрелый плод всех сортов (стадия MF) содержит сравнимые количества хлорофиллов и каротиноидов, что характеризует ткани плодов как фотосинтезирующие. В бланжевых плодах (стадия IR) содержание хлорофиллов снижалось в 1.46–5.60 раза в зависимости от сорта. В спелых плодах (стадия RF) хлорофилл обнаружен в значительном количестве у сортов Сладкий шоколад, Шоколадный, Несозревающий, а в малом количестве – у сортов Гогошары и Мечта хозяйки. В спелых плодах сортов Желтый букет, Кармин и Мария хлорофиллы отсутствовали.

Количество каротиноидов в незрелых плодах было максимальным у сортов Шоколадный и Сладкий шоколад (48.5 и 61.0 мкг/г), тогда как у остальных сортов оно варьировало от 6.8 (Гогошары) до 27.3 мкг/г (Желтый букет) (см. табл. 1). В случае спелых плодов первенство осталось за сортами с шоколадной окраской: наиболее высокое содержание каротиноидов отмечено у сорта Шоколадный (1009.90 мкг/г); у сорта Сладкий шоколад оно в 1.7 раза ниже, а у красноплодных сортов Кармин и Мария – в 1.94

и 2.48 раза соответственно (см. табл. 1). В спелых плодах остальных четырех сортов каротиноидов было на порядок меньше. Интересно, что при сходном малом содержании суммы каротиноидов спелые плоды этих сортов имели разную окраску: Желтый букет – желтую, Мечта хозяйки – красную, Несозревающий и Гогошары – зеленую и красно-зеленую. При этом Несозревающий и Гогошары характеризовались в среднем в 2 раза меньшим содержанием каротиноидов по сравнению с сортами Желтый букет и Мечта хозяйки (см. табл. 1).

Исходя из полученных биохимических данных можно предположить, что сорта, спелый плод которых имеет красную окраску, синтезируют традиционные для перцев красные пигменты – каротиноиды капсантин и капсорубин. В сортах с коричневыми плодами окраска формируется из двух составляющих – красных каротиноидов и зеленых хлорофиллов. Желтая или зеленая окраска плодов на стадии биологической спелости, по всей вероятности, определяется присутствием желтоокрашенных каротиноидов (лютеин, зеаксантин) и хлорофиллов соответственно.

Профиль коэкспрессии генов PSY1 и PSY2 в перикарпе плодов в процессе созревания

Накопление каротиноидов в плодах прямо связывают с уровнем экспрессии PSY1 (Meléndez-Martínez et al., 2010), однако, несмотря на то что PSY2 в основном экспрессируется в фотосинтезирующих тканях, его транскрипты обнаружены также в тканях плода (Jang et al., 2020). Экспрессия генов PSY1 и PSY2 была охарактеризована в листьях и перикарпе (кожица и мякоть) плодов на трех стадиях созревания (MF, IR, RF) у четырех сортов перца (рис. 3). В анализ были взяты сорта Желтый букет, Сладкий шоколад, Кармин и Несозревающий, контрастные по окраске спелого плода (RF) – желтой, коричневой, темно-красной и зеленой соответственно (см. табл. 1). Сорта Кармин и Сладкий шоколад отличались высоким содержанием каротиноидов в спелых плодах (520.2 и 597.0 мкг/г), тогда как сорта Несозревающий и Желтый букет накапливали 55.9 и 107.7 мкг/г соответственно.

В листьях анализируемых сортов перца уровни экспрессии PSY1 значительно варьировали. Так, у сортов Несозревающий и Желтый букет уровни транскрипции были схожи (0.15 и 0.17), у сорта Сладкий шоколад – в 3 раза ниже (0.054), а у сорта Кармин уровень транскрипции данного гена составил 0.012 (см. рис. 3). В плодах наблюдался сходный паттерн экспрессии PSY1: увеличение уровня транскрипции в процессе созревания плода. При этом максимальный уровень экспрессии PSY1 наблюдался в спелом плоде сорта Сладкий шоколад, а минимальный – у сорта Несозревающий (см. рис. 3).

Фитоинсинтаза PSY2 считается более специфичной для фотосинтезирующих тканей (Giorgio et al., 2008). В зеленом незрелом плоде (стадия MF) все анализируемые сорта характеризовались присутствием хлорофиллов: самый высокий показатель у сорта Сладкий шоколад, самый низкий – у сорта Несозревающий. В зрелых плодах хлорофилл присутствовал только у сортов Сладкий шоколад и Несозревающий (у первого в 3 раза выше, чем у второго).

Уровень экспрессии гена PSY2 в листьях сорта Сладкий шоколад оказался в 2–3 раза выше, чем в листьях трех дру-

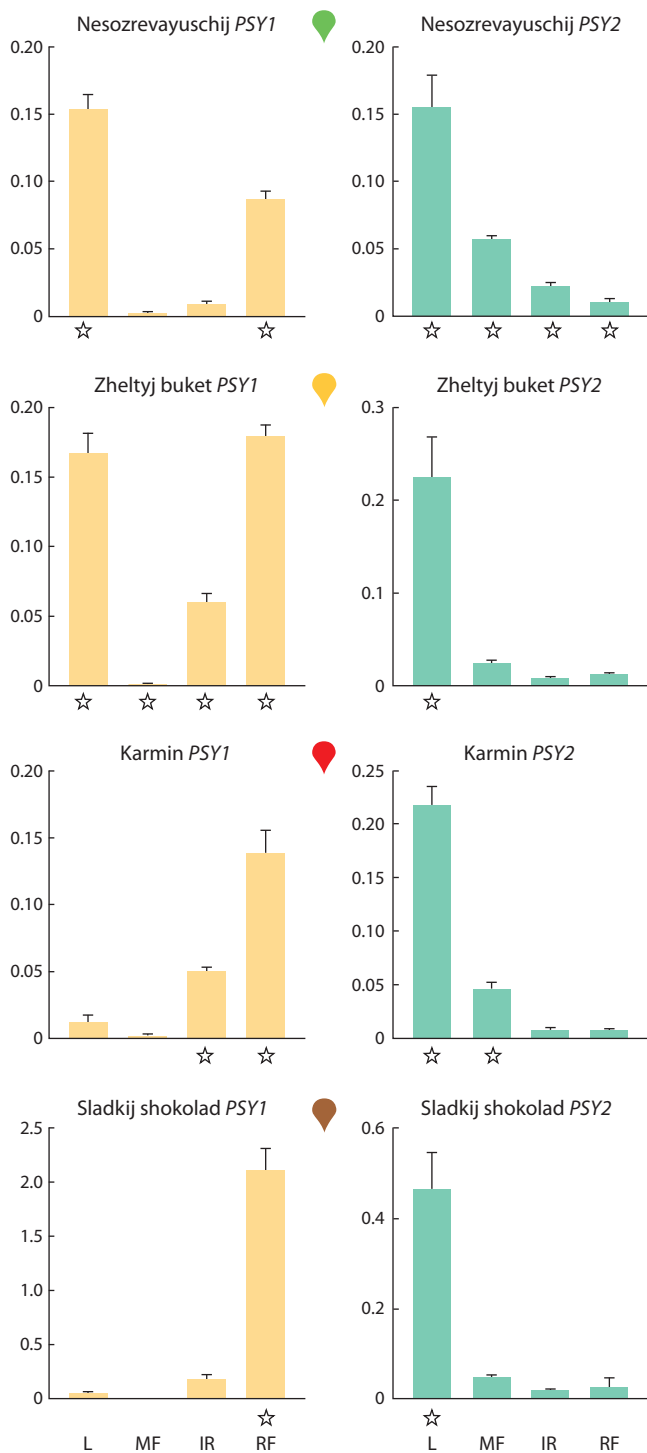


Рис. 3. Профиль экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* в листьях (L) и плодах на трех стадиях созревания (MF – незрелый плод, IR – бланжевая спелость, RF – биологическая спелость) образцов сортов перца *C. annuum*.

Звездочками обозначены значения экспрессии генов, имеющие значимые отличия от экспрессии во всех других тканях одного образца.

гих сортов, где экспрессия была сопоставима (см. рис. 3). Анализ экспрессии *PSY2* показал присутствие его транскриптов в перикарпе плода на всех стадиях развития у всех четырех анализируемых сортов. В перикарпе незрелого плода (стадия MF) экспрессия *PSY2* была приблизительно

на одном уровне у сортов Несозревающий (0.057), Сладкий шоколад (0.050) и Кармин (0.046), тогда как у сорта Желтый букет – в 2 раза ниже (0.025) (см. рис. 3). По мере созревания плодов экспрессия *PSY2* снижалась. В зрелых плодах (стадия RF) сортов Несозревающий, Желтый букет и Кармин уровень транскрипции *PSY2* был сопоставим, а у сорта Сладкий шоколад – выше в 2.3–3.5 раза (см. рис. 3).

Можно предположить, что наличие экспрессии *PSY2* в зрелых плодах сортов перца связано с сохранением хлоропластов. Об этом свидетельствует содержание хлорофилла в перикарпе спелых плодов, например у сортов Несозревающий и Сладкий шоколад (см. табл. 1). У сортов Желтый букет и Кармин также выявлена экспрессия *PSY2* в зрелых плодах, при этом хлорофилл не обнаружен. Вероятно, *PSY2* может работать не только в хлоропластах, но и в хромопластах. Ранее на примере сорта перца MicroPer Yellow (отсутствие транскрипции гена *PSY1*) было показано, что синтез и накопление в хромопластах плода желтых пигментов связаны с экспрессией *PSY2* (Jang et al., 2020).

Регуляция синтеза и накопления каротиноидов в плодах перца является сложным процессом (Deruère et al., 1994; Kilcrease et al., 2015). В зрелых плодах каротиноиды накапливаются в хромопластах в специализированных глобулах, и если нарушено их образование, то каротиноиды могут синтезироваться, но не накапливаться (Osorio, 2019). Образование глобул находится под контролем белка Orange, который одновременно предотвращает деградацию каротиноидов и стабилизирует активность фитоинсинтазы PSY (Osorio, 2019). У сорта Несозревающий по мере созревания сохраняется зеленая окраска плода, а окраска мякоти изменяется от светло-зеленой до желто-зеленой. При этом, в отличие от трех других анализируемых сортов перца, не наблюдается значительного роста содержания каротиноидов (см. табл. 1), и уровень транскрипции *PSY1* в зрелом плоде сорта Несозревающий в 1.6 и 2.1 раза ниже, чем у сортов Кармин и Желтый букет соответственно. Можно предположить, что у сорта Несозревающий нарушен ряд процессов, характерных для созревания плода, таких как деградация хлорофилла, трансформация хлоропластов в хромопласты и/или синтез хромопластов *de novo* (Kilcrease et al., 2015; Berry et al., 2019). Однако плоды сорта Несозревающий созревают (семена полностью сформированы и жизнеспособны), хотя и не происходит заметного изменения в окраске перикарпа. Это подтверждает показанное ранее отсутствие связи каротиногенеза в плодах с процессом созревания (Fraser et al., 2007).

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании у девяти сортов *C. annuum* с различной окраской спелого плода были идентифицированы и охарактеризованы последовательности генов фитоинсинтаз *PSY1* и *PSY2*, определен профиль коэкспрессии этих генов в вегетативных и репродуктивных органах, а также проведена оценка возможной корреляции с суммарным содержанием каротиноидов. Получены подтверждения прямой зависимости между уровнем экспрессии гена *PSY1* и каротиноидной пигмен-

тацией плода в процессе созревания. Показано, что у сорта Несозревающий нарушен типичный для плодов перца паттерн пигментации перикарпа в процессе созревания, что может быть связано с нарушениями образования хромопластов.

Список литературы / References

- Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов. *Физиология растений*. 2020;67(6):644-653. DOI 10.31857/S0015330320050048.
[Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020;67(6):1054-1062. DOI 10.1134/S1021443720050040.]
- Bemer M., Karlova R., Ballester A.R., Tikunov Y.M., Bovy A.G., Wolters-Arts M., de Barros Rossetto P., Angenent G.C., de Maagd R.A. The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *Plant Cell*. 2012;24:4437. DOI 10.1105/tpc.112.103283.
- Berry H.M., Rickett D.V., Baxter C.J., Enfissi E.M.A., Fraser P.D. Carotenoid biosynthesis and sequestration in red chilli pepper fruit and its impact on colour intensity traits. *J. Exp. Bot.* 2019;70(10):2637-2650. DOI 10.1093/jxb/erz086.
- Caο H., Luo H., Yuan H., Eissa M.A., Thannhauser T.W., Welsch R., Hao Y.-J., Cheng L., Li L. A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases. *Plant Physiol.* 2019;180(4):1988-2003. DOI 10.1104/pp.19.00384.
- Cervantes-Paz B., Yahia E.M., Ornelas-Paz J.J., Victoria-Campos C.I., Ibarra-Junqueira V., Pérez-Martínez J.D., Escalante-Minakata P. Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at intermediate stages of ripening. *Food Chem.* 2014;146:188-196. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.09.060.
- Deruère J., Römer S., d'Harlingue A., Backhaus R.A., Kuntz M., Camara B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell*. 1994;6:119-133. DOI 10.2307/3869680.
- Dias G.B., Gomes V.M., Moraes T.M., Zottich U.P., Rabelo G.R., Carvalho A.O., Moulin M., Gonçalves L.S., Rodrigues R., Da Cunha M. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genet. Mol. Res.* 2013;12:6488-6501. DOI 10.4238/2013.february.28.29.
- Enfissi E.M., Nogueira M., Bramley P.M., Fraser P.D. The regulation of carotenoid formation in tomato fruit. *Plant J.* 2017;89:774-788. DOI 10.1111/tpj.13428.
- Fraser P.D., Enfissi E.M., Halket J.M., Truesdale M.R., Yu D., Gerish C., Bramley P.M. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell*. 2007;19(10):3194-3211. DOI 10.1105/tpc.106.049817.
- Fraser P.D., Schuch W., Bramley P.M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties. *Planta*. 2000;211:361-369. DOI 10.1007/s004250000293.
- Giorio G., Stigliani A.L., D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J.* 2008;275(3):527-535. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x.
- Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C., Dugo G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 2013;140(4):794-802. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.09.060.
- Giuliano G. Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017;44:169-180. DOI 10.1016/j.copbio.2017.02.001.
- Ha S.H., Kim J.B., Park J.S., Lee S.-W., Cho K.-J. 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. *J. Exp. Bot.* 2007;58:3135-3144. DOI 10.1093/jxb/erm132.
- Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H., Villalon B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1713-1720. DOI 10.1021/jf990916t.
- Jang S.J., Jeong H.B., Jung A., Kang M.-Y., Kim S., Ha S.-H., Kwon J.-K., Kang B.-C. *Phytoene Synthase 2* can compensate for the absence of *Psy1* in *Capsicum* fruit. *J. Exp. Bot.* 2020;71(12):3417-3427. pii: eraa155. DOI 10.1093/jxb/eraa155.
- Kachanovsky D.E., Filler S., Isaacson T., Hirschberg J. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of *phytoene synthase 1* expression by cis-carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:19021-19026. DOI 10.1073/pnas.1214808109.
- Kilcrease J., Rodriguez-Uribe L., Richins R.D., Arcos J.M.G., Victorino J., O'Connell M.A. Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annuum* fruit pericarp. *Plant Sci.* 2015;232:57-66. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.12.014.
- Levy A., Hare S., Palevitch D., Akiri B., Menagem E., Kanner J. Carotenoid pigments and β -carotene in paprika fruits (*Capsicum* spp.) with different genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 1995;43:362-366. DOI 10.1021/jf00050a019.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 1987;148:350-382. DOI 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Márkus F., Daood H.G., Kapitány J., Biacs P.A. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47:100-107. DOI 10.1021/jf980485z.
- Meléndez-Martínez A.J., Fraser P.D., Bramley P.M. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to *in vitro* antioxidant activity. *Phytochemistry*. 2010;71(10):1104-1114. DOI 10.1016/j.phytochem.2010.03.021.
- Mohd Hassan N., Yusof N.A., Yahaya A.F., Mohd Rozali N.N., Othman R. Carotenoids of *Capsicum* fruits: pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(10):469. DOI 10.3390/antiox8100469.
- Moscone E.A., Scaldaferrò M.A., Grabielle M., Cecchini N.M., Sánchez García Y., Jarret R., Daviña J.R., Ducasse D.A., Barboza G.E., Ehrendorfer F. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hort.* 2007;745:137-170. DOI 10.17660/ActaHortic.2007.745.5.
- Orosio C.E. The role of orange gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1235. DOI 10.3389/fpls.2019.01235.
- Puchooa D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Afr. J. Biotech.* 2004;3:253-255. DOI 10.5897/ajb2004.000-2046.
- Shumskaya M., Bradbury L.M.T., Monaco R.R., Wurtzel E.T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant Cell*. 2012;24:3725-3741. DOI 10.1105/tpc.112.104174.
- Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Rus. J. Plant Phys.* 2001;48(5):693-700.
- Stauder R., Welsch R., Camagna M., Kohlen W., Balcke G.U., Tisier A., Walter M.H. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE*

- SYNTHASE* gene family. *Front. Plant Sci.* 2018;9:255. DOI 10.3389/fpls.2018.00255.
- Story E.N., Kopec R.E., Schwartz S.J., Harris G.K. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2010;1:189-210. DOI 10.1146/annurev.food.102308.124120.
- Sun T., Li L. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants. *Plant Sci.* 2020; 290:110331. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110331.
- Sun T., Xu Z., Wu C.T., Janes M., Prinyawiwatkul W., No H.K. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *J. Food Sci.* 2007;72(2):98-102. DOI 10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x.
- Thorup T.A., Tanyolac B., Livingstone K.D., Popovsky S., Paran I., Jahn M. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:11192-11197. DOI 10.1073/pnas.97.21.11192.
- Welsch R., Medina J., Giuliano G., Beyer P., von Lintig J. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 2003;216:523-534. DOI 10.1007/s00425-002-0885-3.
- Zhou X., Welsch R., Yang Y., Álvarez D., Riediger M., Yuan H., Fish T., Liu J., Thannhauser T.W., Li L. *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(11):3558-3563. DOI 10.1073/pnas.1420831112.

ORCID ID

E.A. Dyachenko orcid.org/0000-0002-0570-9751
M.A. Filyushin orcid.org/0000-0003-3668-7601
G.I. Efremov orcid.org/0000-0002-2943-5118
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00016) и частично Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (измерение содержания хлорофилла в плодах).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.05.2020. После доработки 16.07.2020. Принята к публикации 16.07.2020.