

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БИОГЕНЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХОЛОДОВОГО ХРАНЕНИЯ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2023 г. А. В. Кулакова¹, *, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

Каротиноиды представляют собой вторичные метаболиты, которые синтезируются и откладываются во всех типах пластид растений. Данные пигменты играют значимую роль в защите от оксидативного стресса, а также в окраске цветков и запасующих органов растений. Клубни картофеля *Solanum tuberosum* L. синтезируют каротиноиды, в том числе в процессе послеуборочного хранения. В данном исследовании был проведен анализ экспрессии генов пути биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*), а также генов предполагаемой инициации дифференцировки хромoplastов (*OR1* и *OR2*) в динамике длительного холододового хранения (сентябрь, февраль, апрель) клубней картофеля сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда. Было показано, что мРНК *OR1* и *OR2* присутствует в клубнях всех сортов на всех этапах хранения. Для всех анализируемых генов ферментов пути биосинтеза каротиноидов профиль экспрессии по мере хранения клубней характеризовался существенным снижением уровней транскриптов в феврале в сравнении с сентябрем, за некоторыми исключениями. В период с февраля по апрель уровень транскриптов генов менялся несущественно. Проведенный биохимический анализ содержания каротиноидов в динамике холододового хранения показал, что в момент сбора урожая самое высокое содержание каротиноидов в клубнях сорта Утро; клубни остальных сортов характеризовались сходной суммой каротиноидов. По мере хранения с сентября по апрель суммарное содержание каротиноидов изменялось генотип-зависимым образом без какой-либо общей для сортов тенденции. В целом в работе впервые была охарактеризована активность большинства генов пути метаболизма каротиноидов в процессе длительного холододового хранения клубней, что существенно дополняет известные данные по экспрессионному ответу этих генов на абиотический стресс.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, сорта картофеля, хранение клубней, биосинтез каротиноидов, хромoplastы, экспрессия гена.

DOI: 10.31857/S001667582308009X, EDN: ХТТРАИ

Каротиноиды представляют собой бесцветные и пигментированные (желтые, оранжевые и красные) вторичные метаболиты, которые синтезируются и откладываются во всех типах пластид растений (кроме пропластид) [1, 2]. В наибольших количествах каротиноиды накапливаются в секвестрирующих структурах внутри хромoplastов [1, 2]. Специализирующиеся на синтезе и хранении крахмала амилопласты также способны запасать большие количества каротиноидов, что показано на примере зерен кукурузы и клубней картофеля с темно-желтой окраской [3, 4]. В растениях каротиноиды являются значимыми компонентами механизмов фотосинтеза и фотозащиты, играют существенную роль в привлечении опылителей цветков и распространителей семян, а также по-

ставляют важные компоненты рациона человека (провитамин А и антиоксиданты) [1, 2].

Первым ферментом пути биосинтеза каротиноидов является фитоинсинтаза PSY, катализирующая образование 15-цис-фитоина. Последующие реакции десатурации (под действием фитоиндесатуразы PDS и ζ-каротиндесатуразы ZDS) и цис-транс-изомеризации (15-цис-ζ-каротинизомераза Z-ISO и каротиноид-цис-транс-изомераза CRTISO) приводят к синтезу полностью-транс-ликопина. Ликопин-β-циклаза (LCYB) и ликопин-ε-циклаза (LCYE) иницируют циклизацию ликопина в β- и α-каротин и далее в β/β- (зеаксантин) и ε/β- (лютеин) ксантофиллы соответственно. Из зеаксантина образуются антраксантин, виолаксантин (зеаксантинэпоксидаза ZEP; реакция обратима с помощью виолаксантиндеэпоксидазы

VDE) и неоксантин (неоксантинсинтаза NSY) [5]. Каротиноиды β, β -ветви расщепляются до стриголактонов (субстрат β -каротин; каротиноид-расщепляющие диоксигеназы CCD), а также абсцизовой кислоты (АБК; субстраты 9-*цис*-виолаксантин и 9-*цис*-неоксантин; 9-*цис*-эпоксикаротиноид диоксигеназы NCED) [6–9] (рис. S1).

Данные о биогенезе каротиноидов активно используются в метаболической инженерии сельскохозяйственных растений, основанной на манипуляциях с уровнями экспрессии генов ферментов пути. Конститутивная суперэкспрессия гена фитоинсинтазы *PSY* увеличивает общее содержание каротиноидов и/или β -каротина у многих культурных видов [10–13]. Такой подход способствовал увеличению суммы каротиноидов в плодах томата *Solanum lycopersicum* L. [14] и клубнях картофеля *Solanum tuberosum* L. [15].

Уровни экспрессии *LCYB* и *LCYE* влияют на соотношение β -каротин/ α -каротин [16–20]. Примерами успеха в направлении повышения содержания β -каротина являются “золотые” рис *Oryza sativa* (с суперэкспрессией гена *PSY* и бактериального гена фитоиндесатуразы *crtI* [21, 22]) и картофель (замалчивание активности гена ликопин-ε-циклазы *LcyE* [16]), а также томаты с плодами оранжевой окраски за счет суперэкспрессии гена ликопин-β-циклазы *LcyB* [23].

Еще одним примером использования данных о биогенезе каротиноидов в биотехнологии агрокультур является картофель, модифицированный для производства в клубнях коммерчески важных кетокаротиноидов, включая астаксантин, за счет инактивированной экспрессии гена зеаксантинэпоксидазы *ZEP* в сочетании с суперэкспрессией гена β -каротинкетотазы *crtO* из цианобактерии *Synechocystis* [24].

Изменяя уровень активности гена *VDE*, кодирующего виолаксантиндеэпоксидазу, использующую аскорбат в качестве восстановителя для превращения виолаксантина в зеаксантин [25], можно регулировать уровень витамина С [26, 27].

Кроме манипуляций с уровнем транскриптов генов биосинтеза каротиноидов, используется также стимуляция образования накапливающих каротиноиды структур. Плоды томата и других плодовых культур с окрашенными плодами накапливают каротиноиды в хромопластах [28], и для изменения содержания пигментов достаточно изменения уровней экспрессии генов биосинтеза каротиноидов. В случае корнеплодов все сложнее. Так, исследование 25 сортов моркови *Daucus carota* L. выявило, что оранжевые и красные корнеплоды содержат большое количество хромопластов с секвестрирующими каротиноиды субструктурами, тогда как у моркови с желтой и белой окраской преобладают амилопласты [29]. Пластиды картофельных клубней представлены в основном крах-

мал-ассоциированными амилопластами и не содержат хромопластов [4], к формированию которых не приводит даже высокий уровень каротиноидов в темно-желтой мякоти [2].

Показано, что присутствие хромопластов в корнеплодах моркови сцеплено с аллелем *DcOR3^{Leu}* гена *ORANGE (OR)* [29]. Ген *OR*, инициирующий дифференцировку пропластид и/или неокрашенных пластид в хромопласты, впервые выделен из мутанта цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) с оранжевой окраской кочна-соцветия [30]. С использованием гена *OR* получены трансгенные растения картофеля. Продемонстрировано, что суперэкспрессия гена *OR* не меняет активности генов биогенеза каротиноидов, однако приводит к 6-кратному повышению содержания суммы каротиноидов в клубнях за счет их накопления и еще большему его росту в процессе длительного холодового хранения [30]. При этом в клубнях образуются структуры, похожие на хромопласты, и увеличение суммы каротиноидов есть следствие появления их накопителей [2].

Содержание каротиноидов в корнеплодах важно не только с точки зрения их диетической ценности, но и как соединений, которые (включая апокаротиноиды) играют центральную роль в обеспечении развития и стрессовой адаптации растений [31]. Таким образом, повышенное содержание тех или иных соединений каротиноидов в клубнях картофеля [15, 16, 24] может быть важно еще и для сохранения клубней в их наиболее съедобном и товарном состоянии при длительном содержании в картофелехранилищах. Потери качества при хранении связаны с дыханием, прорастанием и высушиванием клубней, а также со стрессами — распространением болезней и повреждением экстремальными температурами [32]. Объем потерь, как правило, зависит от сорта (генотипа), условий до и во время хранения, а также его продолжительности [32].

Растения картофеля недостаточно охарактеризованы по содержанию каротиноидов и по экспрессии генов каротиногенеза в динамике как развития, так и хранения клубней. Тем не менее продемонстрирована генотип-зависимость уровня экспрессии отдельных генов каротиногенеза на разных стадиях развития клубней [33]. На примере ряда сортов картофеля показана связь активности семи генов данного пути, а также содержания и соотношения соответствующих типов каротиноидов в клубнях, с генотипом и условиями выращивания [34, 35]. Прямая зависимость от температуры хранения выявлена для содержания АБК в клубнях шести генотипов картофеля; кроме того, трехнедельное хранение приводит к почти двукратному снижению количества этого гормона [36]. Однако отметим, что ранее работы по изучению экспрессии генов биогенеза каротиноидов при низких

температурах проводились на малом количестве генов и на коротких сроках хранения клубней.

Целью настоящей работы стала оценка активности 18 генов биогенеза каротиноидов и апокаротиноидов, а также изменений суммарного содержания каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля российской селекции в динамике длительного (в точках 0, 3.5–4 и 7 мес.) низкотемпературного (+3°C) хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для исследования использовали образцы картофеля *S. tuberosum* пяти сортов: Барин (каталожный номер 8854151), Красавчик (9553926), Утро (9253216), Северное сияние (8558886) и Надежда (9463920) (<https://teestr.gossortrf.ru/>). Сорта являются среднеспелыми (исключение – среднеранний сорт Красавчик) и различаются окраской клубней: Барин (кожура/мякоть – светло-бежевая/светло-желтая), Красавчик (красная/светло-кремовая), Утро (светло-бежевая/светло-желтая), Северное сияние (синяя/сине-пестрая) и Надежда (светло-бежевая/кремовая) (рис. S2) (<https://teestr.gossortrf.ru/>).

В 2022 г. растения выращивали в полевых условиях ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Московская обл., Россия). Клубни собирали в первой половине сентября. Материал одного свежесобранного клубня каждого анализируемого сорта подготавливали для дальнейшего анализа. Как правило, количество каротиноидов измеряют в мякоти клубней, либо в совокупности с кожурой (например, [35]). Прямоугольную секцию продольного участка клубня (~1.0 г), которая охватывала все ткани от кожуры до сердцевины мякоти, вырезали и измельчали растиранием в жидком азоте, разделяли на весовые аликвоты (по 0.1–0.2 г) и хранили при –80°C. Весовая доля кожуры в образце составляла менее 0.5% от веса вырезанного клубневого сектора. Остальной урожай, предварительно обработанный (фумигация, “мумификация”, проветривание, антисептирование), закладывали на хранение в закрываемое картофелехранилище ВНИИКХ (в условиях воздушного вентилирования и низкой положительной температуры +3°C). Выбор температуры хранения базировался на результатах оценки содержания редуцирующих сахаров в клубнях во время хранения при разных температурах, показавшей существенную динамику изменений при +3°C [37]. В начале февраля (4.5–5 мес. после сбора урожая; учитывая период подготовительной обработки клубней (около месяца), это приблизительно середина (3.5–4 мес.) срока хранения при +3°C) и конце апреля (8 мес. после сбора урожая (7 мес. хранения при +3°C); перед высадкой) отбирали по одному клубню каждого сорта; тканевый материал для анализа подготавливали аналогично сентябрь-

скому. Таким образом, был отобран материал клубней пяти сортов, соответствующий временным точкам 0 (сбор урожая, сентябрь), ~3.5–4 мес. при +3°C (февраль) и ~7 мес. при +3°C (апрель).

Определение содержания каротиноидов. Суммарное содержание каротиноидов определяли с использованием модифицированного протокола метода Фолча [38, 39] в трех технических повторах. Для этого 0.2 г растительной ткани гомогенизировали в растворе хлороформ-метанол (2 : 1 [об/об]) в присутствии следовых количеств Mg₂CO₃, инкубировали 1 ч при 4°C и центрифугировали 10 мин при 4000 об./мин и 4°C. В хлороформной фазе измеряли содержание суммы каротиноидов, регистрируя спектры поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия). Для статистической обработки результатов применяли программу GraphPad Prism v8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение (*M*) со стандартным отклонением (\pm SD) на основе трех технических повторов для каждого варианта измерения. Для оценки различий использовали *t*-test (*p* < 0.05 указывает на статистическую значимость различий).

Выделение РНК, синтез кДНК. Из 50–100 мг ткани клубней выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия). Полученные препараты дополнительно чистили от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN) и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Определение профиля экспрессии генов и оценка его корреляции с суммарным содержанием каротиноидов. Уровень транскриптов генов *OR1*, *OR2*, *PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6* в клубнях картофеля определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Данные нормализовали на уровень транскриптов референсных генов *elongation factor 1-alpha (elf1)* и *SEC3A* [40, 41]. Для реакции использовали 3 нг препарата кДНК, разработанные нами праймеры (последовательности праймеров и идентификаторы генов в базе данных NCBI приведены в табл. 1) и набор “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия). Реакции проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) в трех технических

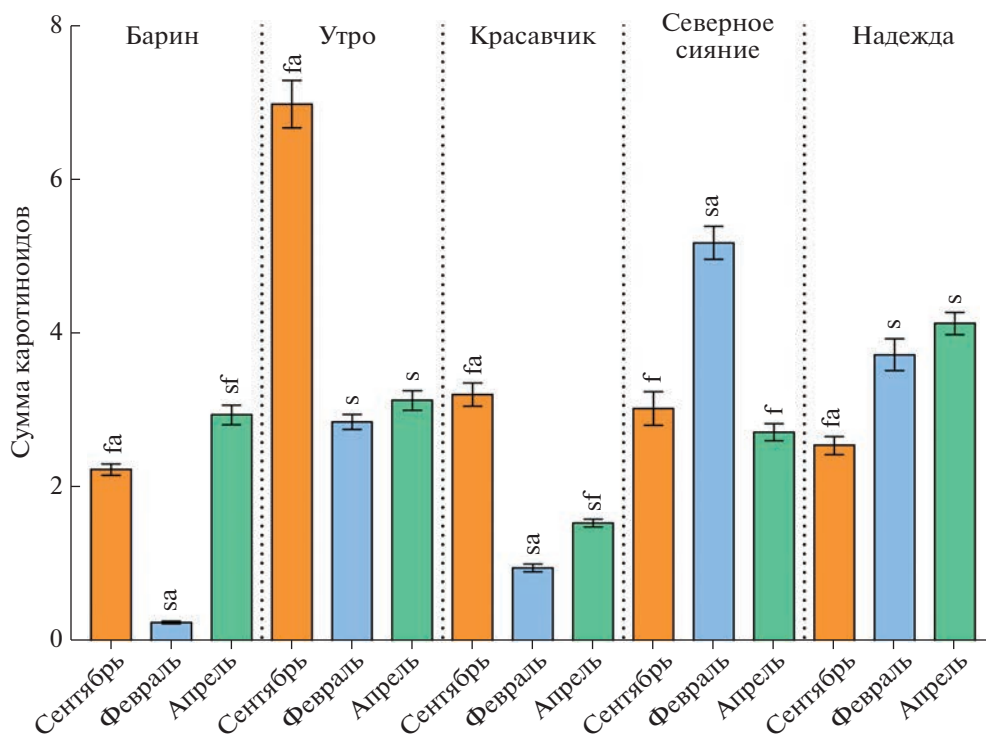


Рис. 1. Суммарное содержание каротиноидов (мкг/г сырого веса) в клубнях картофеля сортов Барин, Утро, Красавчик, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного (+3°C) хранения (сентябрь, февраль, апрель). Буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения суммы каротиноидов от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель).

повторах в следующих условиях: предварительная денатурация (5 мин, 95°C); 40 циклов (15 с, 95°C; 50 с, 62°C). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>). Регрессионный анализ (поиск корреляции между уровнем экспрессии гена и содержанием каротиноидов) проводили с помощью программы GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>). Критерии наличия корреляции: значения коэффициента корреляции Пирсона (r) > 0.5 и p -value < 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение суммарного содержания каротиноидов в клубнях сортов картофеля

Был проведен биохимический анализ суммарного содержания каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля в динамике холодового хранения: свежесобранные клубни (сентябрь), спустя 3.5–4 мес. (февраль) и спустя 7 мес. (апрель) хранения при +3°C (рис. 1).

В сентябре самое высокое содержание каротиноидов оказалось в клубнях сорта Утро; клубни остальных сортов характеризовались меньшей,

сходной между сортами суммой каротиноидов (рис. 1). В феврале показатели упали у сортов Красавчик, Барин и Утро и выросли у сортов Надежда и Северное сияние. В апреле по сравнению с февралем значения суммы каротиноидов в клубнях сортов поднялись, кроме сорта Северное сияние (падение до сентябрьского уровня). В сравнении с сентябрем содержание каротиноидов выросло у сортов Надежда и Барин, снизилось у сортов Красавчик и Утро и не изменилось у сорта Северное сияние.

Таким образом, было выявлено, что при низкотемпературном хранении клубней картофеля с сентября по апрель содержание суммы каротиноидов изменяется в зависимости от генотипа, без какой-либо общей для сортов тенденции.

Определение профиля экспрессии генов биогенеза каротиноидов

В тех же тканях, которые были использованы для определения содержания каротиноидов, был проведен анализ экспрессии 16 генов пути биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*) в динамике длительного низкотемпературного хранения клубней (рис. 2–5).

Таблица 1. Используемые в работе последовательности праймеров

| Ген | NCBI Gene ID | Последовательность праймера (5' → 3') ² |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| <i>OR1</i> | XM_006358136.2 LOC102601642 | GTGGACTTCTAGCACCCAGT AGAGATCACCCCAACTGCAC |
| <i>OR2</i> | XM_006341022.2 LOC102594717 | GGTCAGATGCAGTTTCAAGAAATC TGGCATCTCATTTTCATCTTCACC |
| <i>PSY1</i> | XM_006343240.2 LOC102593756 | CATGCTCGATGGTGCTTTGTC GACTTCCTCAAGTCCATACGCA |
| <i>PSY2</i> | XM_015309093.1 LOC102589336 | AACTGAGCTCTGCTAGTAGATG GCACTAGAGATCTTGCATAAGCA |
| <i>PSY3</i> | XM_006354167.1 LOC102603193 | GCCTAGTTTAGCCATTCAATAGAC GCCTAGAGTTGATCGAACGATTC |
| <i>PDS</i> | XM_015306724.1 LOC102577582 | GAAGCTTTACCCGCTCCTTTAAA CTTGCTTTCTCATCCAGTCCTT |
| <i>ZDS</i> | XM_015308927.1 LOC102598493 | CAGCAGATACGCAATCTAGAT ACAGTCAATGAATCCAAGAGCA |
| <i>Z-ISO</i> | XM_015309776.1 LOC102600257 | GGATTGACAATTCTACTGGATTTGG CTAGCAAGACCACTGTGGACT |
| <i>CRTISO</i> | XM_006339123.2 LOC102591604 | ATGAAGCGAAGAAAGAGCTTGT GCAAGGTATCGTCTGTGGGTCT |
| <i>LCYB1</i> | XM_006351202.2 LOC102597428 | TGTCTTCATGGTGAGCACTTACT CAGGATTTCAAGAAAGTCCCTAC |
| <i>LCYB2</i> | XM_006364371.2 LOC102595971 | CAAGATTATAGGACCCCATTTGC GGCTTCACAGAGCTAAAGGTAC |
| <i>LCYE</i> | XM_006353482.2 LOC102577922 | TATGTCAGACACGACGCTCAAT CATGCTAGCAGCAGCACCA |
| <i>VDE</i> | XM_006340432.2 LOC102588520 | CCTGATGAAACAGAATGTCAG AGTCACCAACATCAGATTTACGA |
| <i>ZEP</i> | NM_001287910.1 LOC102592281 | ATGAATGCTGGCTGCATCACT AAGTCCACGTTCCACTGCT |
| <i>NSY</i> | NM_001318672.1 LOC102601215 | TCGGGCTCAATTCGACGTGA ATGGCCTATGACTTGTGTACATAT |
| <i>NCED1</i> | NM_001288174.1 LOC102577783 | TGCTCTTAGCTACGATGTGAT GCGAAATCATGCATCATTGTTGG |
| <i>NCED2</i> | NM_001288034.1 LOC102577733 | TATGCCCGTGGAGTTTTCGG GTTTGAAGATCGCCAGAAGGCAA |
| <i>NCED6</i> | XM_006349464.2 LOC102579540 | GTGGTATTCAAGTTATCCGAG CACTACATTTTGGCCATGGTTC |
| <i>ef1</i> ¹ | LOC102600998 | ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA |
| <i>SEC3A</i> ¹ | LOC102599118 | GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTC-CGCA |

Примечание. ¹ – данные из [40, 41]. Праймеры разрабатывали на основе доступных в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) транскриптов генов у нескольких видов рода *Solanum* (включая картофель, томат и баклажан) и проверяли на специфичность (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); последовательности праймеров разделены как минимум одним интроном. Для выравнивания последовательностей использовали пакет программ MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>).

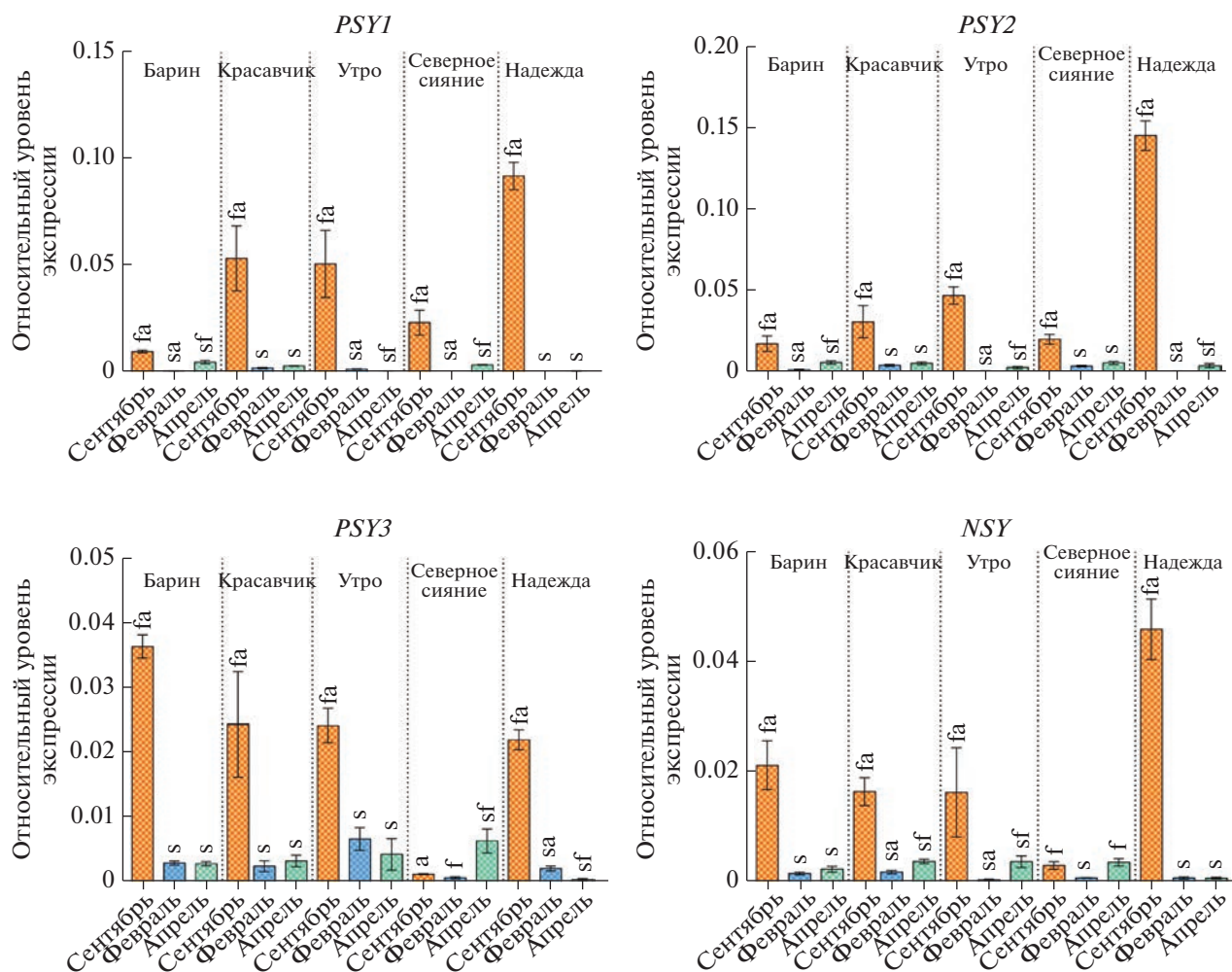


Рис. 2. Профиль экспрессии генов *PSY1*, *PSY2*, *PSY3* и *NSY* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель). Для рис. 2–6 буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения экспрессии гена от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель).

Было показано, что в сентябре наиболее высокий уровень экспрессии генов характерен для клубней сорта Надежда, за исключением *PSY3* (выше у сорта Барин) и *LCYE* (выше у сортов Северное сияние и Утро). Самыми низкими уровнями отличался сорт Северное сияние, кроме генов *LCYE* (напротив, самый высокий уровень), *PSY1* и *NCED1* (ниже у сорта Барин) (рис. 2–5).

Профиль экспрессии всех анализируемых генов биосинтеза каротиноидов по мере хранения клубней характеризовался существенным снижением уровней транскриптов в феврале в сравнении с сентябрем, за некоторыми исключениями (рис. 2–5). А именно: неизменным остался уровень транскриптов *CRTISO*, *LCYB1* и *NCED1* у сорта Северное сияние, одновременно вырос уровень транскриптов *LCYE* и *NCED1* у сорта Барин (рис. 3, 5).

В период с февраля по апрель, уровень транскриптов генов менялся незначительно, однако статистически значимо (рис. 2–5). Так, в клубнях сорта Барин возросла экспрессия генов *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *VDE* и *ZDS* и упала – *Z-ISO*. В случае сорта Красавчик повысился уровень транскриптов *NSY*, *CRTISO*, *LCYB1*, *VDE*, *ZDS*, *Z-ISO*, *ZEP*, *LCYE*, *NCED2* и *NCED6*. Клубни сорта Утро характеризовались ростом экспрессии генов *PSY2*, *NSY*, *LCYB2*, *VDE*, *ZDS*, *Z-ISO* и *LCYE*, а также падением уровня *PSY1*. В случае сорта Северное сияние произошло повышение активности генов *PSY1*, *PSY3*, *NSY*, *LCYB1*, *LCYB2*, *VDE*, *ZDS*, *ZEP*, *LCYE*, *NCED2* и *NCED6*. В клубнях сорта Надежда поднялся уровень транскриптов *PSY2*, *PDS*, *LYCB1*, *VDE*, *ZDS* и *ZEP* и упал – *PSY3* (рис. 2–5).

Таким образом, мы наблюдали, за некоторым исключением, общую для всех сортов тенденцию к снижению уровня экспрессии анализируемых

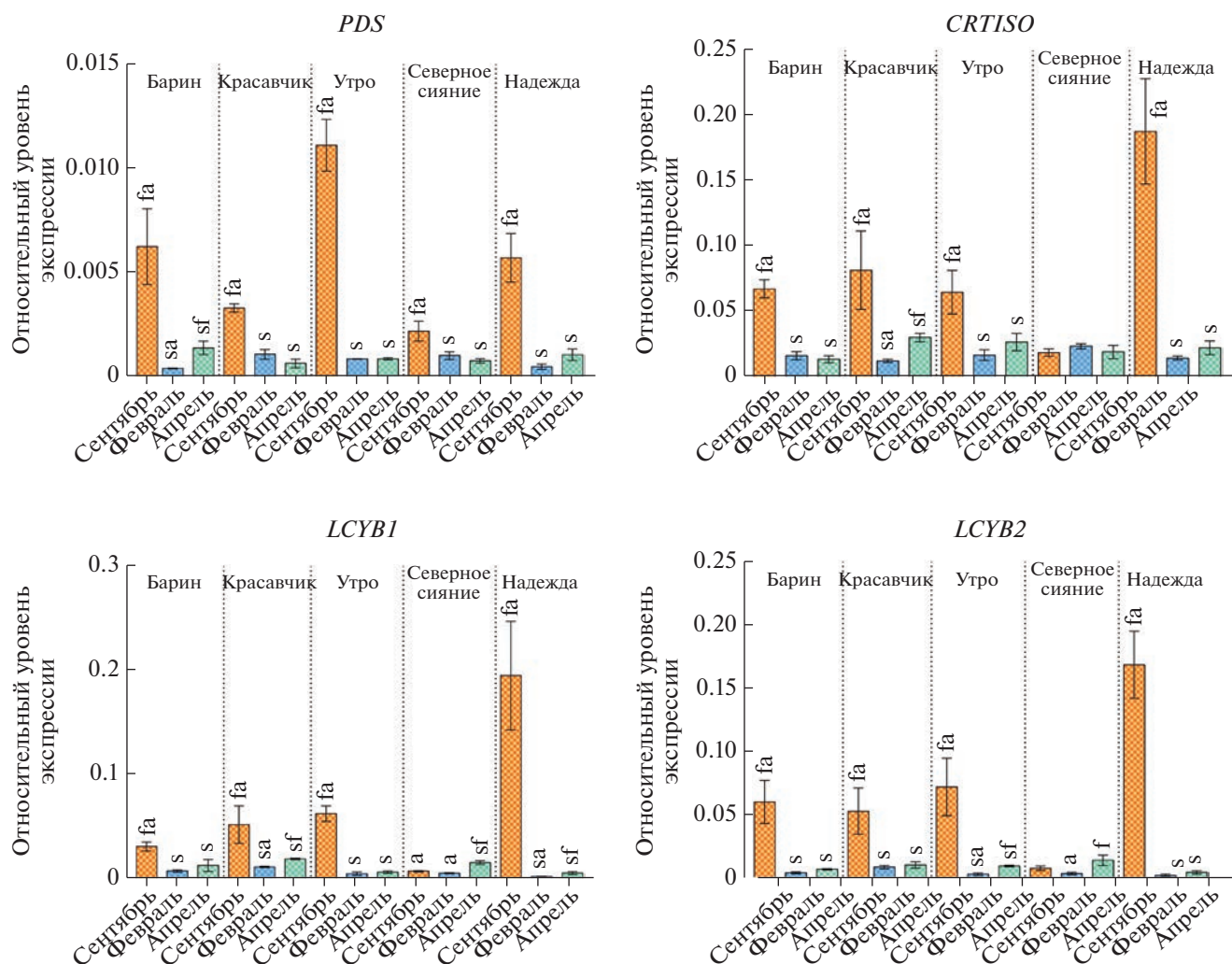


Рис. 3. Профиль экспрессии генов *PDS*, *CRTISO*, *LCYB1* и *LCYB2* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

генов в период с момента сбора урожая по февраль (низкотемпературное хранение в течение 3.5–4 мес.).

Определение профиля экспрессии генов, предположительно связанных с инициацией дифференцировки хромoplastов

В тех же тканях, которые были использованы для определения содержания каротиноидов, был проведен анализ экспрессии двух генов, вовлеченных в инициацию дифференцировки хромoplastов (*OR1* и *OR2*), в динамике длительного низкотемпературного хранения клубней (рис. 6).

Было показано, что в ткани клубней всех сортов присутствует мРНК *OR1* и *OR2* на сходном (между генами) уровне (~0.01–0.10) (рис. 6). По мере хранения уровень транскриптов *OR1* падал (сорта Барин, Утро и Северное сияние), оставал-

ся неизменным (сорт Красавчик) или возрастал (сорт Надежда). Ген *OR2* имел сходный с *OR1* профиль экспрессии, за исключением уровня транскриптов в клубнях сортов Северное сияние (не менялся) и Надежда (падал) (рис. 6).

С целью оценки возможных корреляций между уровнями транскриптов генов биогенеза каротиноидов и суммарным содержанием каротиноидов в клубнях сортов картофеля при длительном холодом хранении был проведен регрессионный анализ. В результате достоверная корреляция ($p < 0.05$) была обнаружена только в случае гена *PDS* (табл. S1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе был охарактеризован профиль экспрессии генов ферментов биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*,

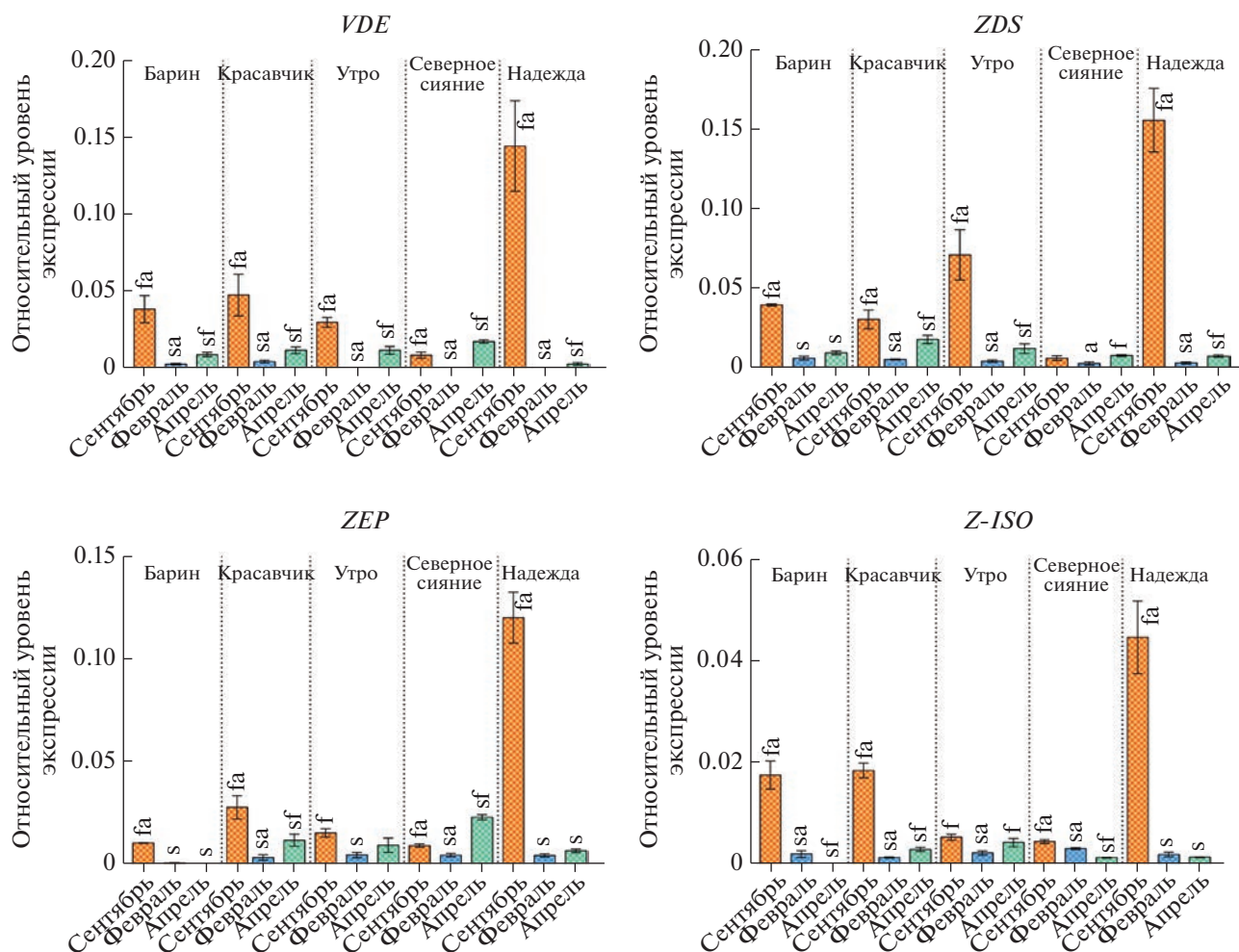


Рис. 4. Профиль экспрессии генов *VDE*, *ZDS*, *ZEP* и *Z-ISO* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

CRTISO, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*), а также генов, связанных с дифференцировкой хромопластов (*OR1* и *OR2*), в клубнях картофеля, хранящихся при температуре +3°C (в момент сбора урожая и спустя 3.5–4 и 7 мес. содержания при +3°C). Одновременно в клубнях было измерено суммарное содержание каротиноидов.

Выбранные для анализа пять сортов делились на образцы с клубневой мякотью кремовой (Надежда и Красавчик), светло-желтой (Барин и Утро) и сине-пестрой (Северное сияние) окраски (рис. S2). Это могло быть связано с относительным содержанием пигментов – каротиноидов (и, в случае сорта Северное сияние, дополнительно антоцианов синих оттенков), так как ранее показано, что и бледно-желтый, и белый цвет клубней согласуется с накоплением ксантофиллов (различные соотношения виолакантина, β-криптоксантина, лютеина, неоксантина и антраксантина) [33, 42, 43].

Анализ суммарного содержания каротиноидов показал отсутствие межсортных различий на момент сбора урожая, за исключением клубней сорта Утро, где значение оказалось примерно в 2 раза больше, чем у остальных четырех сортов (рис. 1), что согласовалось с более желтой окраской мякоти (рис. S2). При этом содержание каротиноидов за 7 мес. при +3°C (к апрелю) выросло (сорты Барин и Надежда), снизилось (сорты Утро и Красавчик) (рис. 1). Учитывая стабильность содержания каротиноидов при 9-месячном хранении в холоде клубней сорта Désirée, при котором заметные различия наблюдаются только в уровнях отдельных каротиноидов [33], исследуемый показатель, по всей вероятности, зависит от генотипа. Повышение содержания каротиноидов может быть также связано с некоторым высушиванием клубней в процессе длительного хранения, поскольку в картофелехранилище ВНИИКХ показатели влажности не контролируются, хотя по современным нормам такой

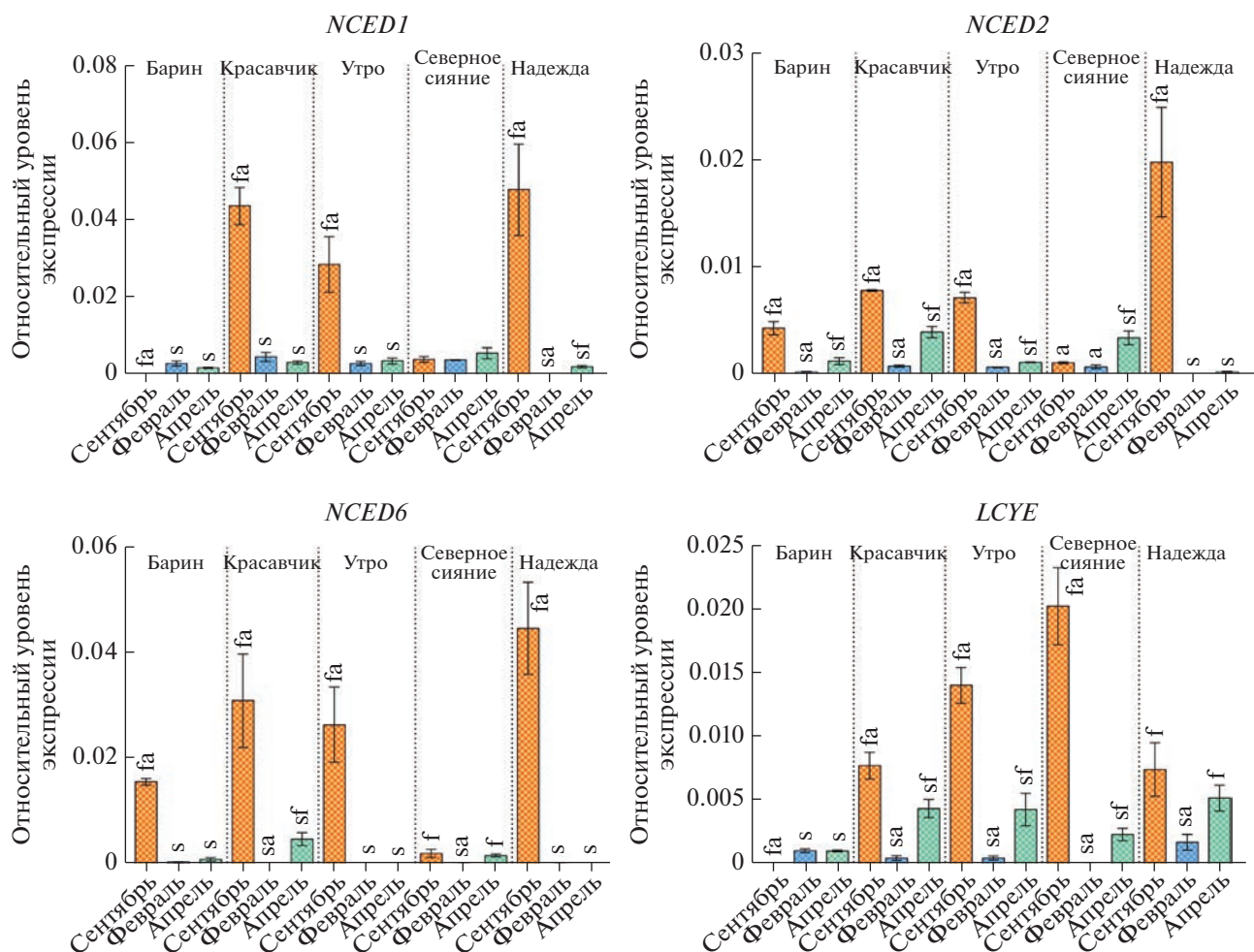


Рис. 5. Профиль экспрессии генов *NCED1*, *NCED2*, *NCED6* и *LCYE* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

контроль необходим во избежание, в частности, существенной потери клубнями влаги [32].

Значения суммы каротиноидов в клубнях анализируемых сортов (рис. 1) были сопоставлены с полученным профилем экспрессии генов биосинтеза каротиноидов (рис. 2–5), так как эти показатели считаются тесно связанными [1]. Ранее анализ экспрессии некоторых генов каротиногенеза в клубнях картофеля в динамике развития клубней [37], а также в свежесобранных клубнях [33, 34] продемонстрировал генотип-зависимость уровня транскриптов генов и отсутствие корреляций уровня с содержанием соответствующих типов каротиноидов. В настоящей работе экспрессия 16 генов биогенеза каротиноидов и апокаротиноидов была впервые определена в динамике длительного низкотемпературного хранения. В результате не было обнаружено зависимости между уровнями транскриптов отдельных генов и суммарным содержанием пигмента, за исключением корреляции для гена *PDS* (табл. S1), продукт которого (фи-

тоиндесатураза) катализирует первые стадии модификации предшественника каротиноидов 15-цис-фитоина [5]. Несмотря на то что для гена *PSY1* была показана прямая корреляция с суммой каротиноидов при исследовании растений различных видов с суперэкспрессией данного гена [10–14], наши результаты такой корреляции не показали (табл. S1). В согласии с исследованиями [34, 37] профили экспрессии генов носили генотип-специфичный характер. Следует отметить, что для всех сортов был характерен повышенный уровень транскриптов почти всех анализируемых генов в сентябре перед закладкой на хранение, в сравнении с февралем–апрелем. Это может свидетельствовать об активно протекающем биогенезе каротиноидов на момент сбора урожая и о состоянии физиологического покоя клубней при хранении. В то же время вариации экспрессии генов, относящихся к разным этапам пути, могут быть связаны с изменениями в типах каротиноидов, которые синтезируются и накапливаются в

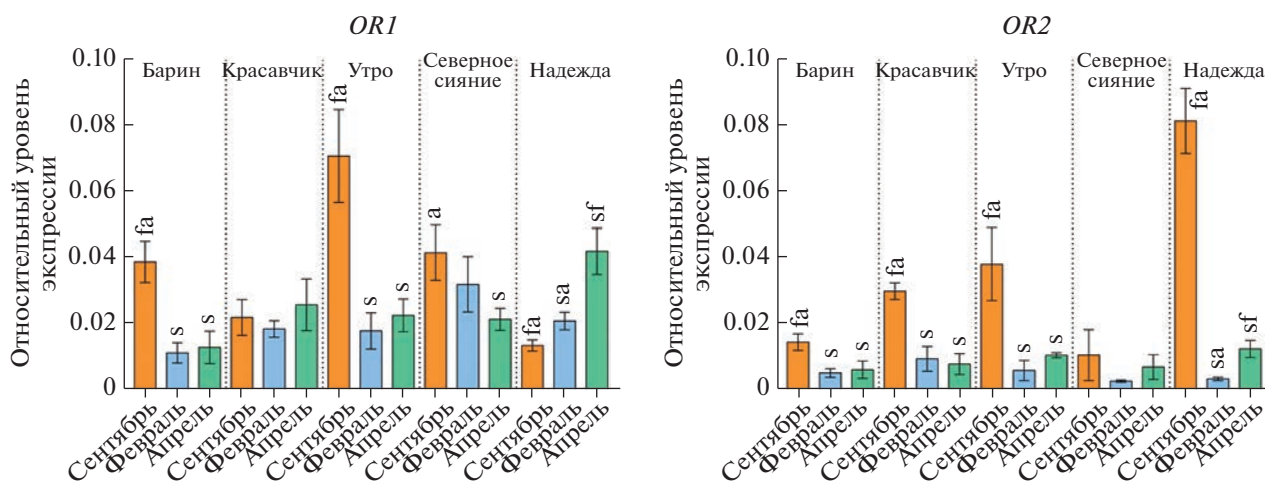


Рис. 6. Профиль экспрессии генов *OR1* и *OR2* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

процессе хранения клубней, как продемонстрировано в ранних исследованиях [33].

Интересно, что в клубнях обнаружались транскрипты всех трех генов *PSY*, кодирующих различные паралоги фитоинсинтазы (рис. 2). *PSY1* считается специфичным преимущественно для хромопластов [44]. Тем не менее суперэкспрессия *PSY1* значительно усиливает каротиногенез в клубнях картофеля [15], где хромопластов нет [4]. Ген *PSY2* функционирует, прежде всего, в хлоропластах фотосинтезирующей ткани [45], вместе с тем его суперэкспрессия приводит к значительному росту содержания каротиноидов в клубнях картофеля, при этом фермент локализуется в амилопластах [46]. Ген *PSY3* участвует в стрессовом ответе, способствуя синтезу апокаротиноидов в корнях растений [47]. Таким образом, присутствие мРНК всех трех генов в сопоставимых (между генами) количествах в клубнях сортов (рис. 2) может указывать на равноценное участие *PSY1* и *PSY2* в определении скорости биосинтеза каротиноидов в амилопластах, а также на реакцию свежесобраных клубней на стресс (погодные условия, патогены и др.) и ее снижение при хранении. Заметим, что в клубнях сорта Северное сияние наблюдался низкий (относительно других сортов) уровень транскриптов *PSY3* в сентябре и его рост по мере хранения (рис. 2). Сине-пестрая окраска клубней данного сорта (рис. S2) имеет антоциановую природу. С учетом известного участия антоцианов в ответе на абиотические стрессы, включая то, что растения с высоким содержанием антоцианов обладают повышенной стрессоустойчивостью [48], можно предположить, что в ответе на стресс в клубнях сорта Северное сияние участвуют, скорее, антоцианы, чем каротиноиды, и сильной активации *PSY3* не происходит.

Учитывая полученные уровни транскриптов генов *LCYB1*, *LCYB2* и *LCYE* (рис. 3, 5) и известное влияние ликопин-циклаза на соотношение β -каротин/ α -каротин [16–20], можно предположить, что в случае сортов Барин и Северное сияние идет преимущественный синтез β , β -каротиноидов и ϵ , β -каротиноидов соответственно, тогда как в клубнях остальных трех сортов они могут синтезироваться в сопоставимых количествах.

Синтез АБК, играющей критическую роль в контроле физиологического покоя клубней [49], осуществляется диоксигеназами *NCED* с использованием β , β -каротиноидов 9-цис-виолаксантина и 9-цис-неоксантина в качестве субстратов [8, 9]. Присутствие в клубнях сортов транскриптов *NCED1*, *NCED2* и *NCED6* (рис. 5) свидетельствует о возможном синтезе АБК. Динамика экспрессии генов с сентября по февраль (рис. 5) согласуется с ранее показанным падением или со стабильностью уровней транскриптов *NCED1* и *NCED2* в клубнях картофеля спустя 5 мес. хранения в холоде в сравнении с моментом сбора урожая [49].

Кроме степени активности генов биосинтеза каротиноидов, на содержание данных пигментов влияет наличие структур, способных накапливать и хранить каротиноиды, а именно хромопластов и специфических липопротеиновых структур внутри них, с дифференцировкой которых связывают ген *OR* [29, 30]. Транскрипты обоих гомологов гена *OR* картофеля – *OR1* и *OR2* были обнаружены нами в сопоставимом (между генами) количестве в клубнях всех анализируемых сортов во всех анализируемых временных точках (рис. 6). Их присутствие было ожидаемым, поскольку активность фитоинсинтазы *PSY* обусловлена формированием белкового комплекса *PSY*–*OR*, в результате чего фермент приобретает каталитически активную форму, в то время как неассоциированный *PSY*

подвергается деградации протеазами Clp [50]. Интересно, что другой функцией *OR* является действие в образовании накапливающих каротиноиды структур [51]. При этом в клубнях картофеля хромопласты отсутствуют [2, 4] и образуются лишь в случае суперэкспрессии мутантного аллеля гена *OR B. oleracea* [30]. Исходя из этого, две вышеупомянутые функции *OR* могут быть разделены, и роли в образовании каротиноид-связывающих структур может способствовать присутствие мутации, изменяющей нужным образом укладку белка *OR*. Действительно, именно мутантный аллель *OR B. oleracea* сцеплен с образованием хромопластов [30]. Оранжевые и красные корнеплоды моркови содержат большое количество хромопластов благодаря присутствию мутантного аллеля *DcOR3^{Leu}* [29]. Также показано, что замена Arg на His в последовательности белка *OR* отвечает за оранжевую окраску мякоти плодов дыни *Cucumis melo* [52]. Аналогичная замена (R90H), внесенная в последовательность белка *OR Arabidopsis thaliana*, способствует появлению хромопластов и супернакоплению каротиноидов в трансгенном каллусе, не меняя при этом способность посттранскрипционно регулировать уровень белка *PSY* [53]. Можно предположить, что *OR1* и *OR2* картофеля осуществляют только первую функцию из вышеозначенных двух, а именно связываются с белками *PSY*, делая их каталитически активными. Косвенным подтверждением этому может быть зеленая окраска плодов картофеля, свидетельствующая об отсутствии хромопластов.

Таким образом, на примере пяти сортов картофеля нами было охарактеризовано влияние длительного холодного хранения клубней на активность 18 генов, участвующих в биогенезе (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP* и *NSY*) и катаболизме (*NCED1*, *NCED2* и *NCED6*) каротиноидов, а также дифференцировке хромопластов (*OR1* и *OR2*). Кроме того, определено суммарное содержание каротиноидов в клубнях в динамике хранения и проведена оценка возможной корреляции между полученными биохимическими и экспрессионными данными. Присутствие мРНК *OR1* и *OR2* на всех этапах хранения позволило предположить структурозависимое разделение двух ролей *ORANGE*, касающихся участия в инициации дифференцировки хромопластов и функциональной активации фитоинсинтазы *PSY*. Снижение (за некоторым исключением) уровня транскриптов анализируемых генов биосинтеза и катаболизма каротиноидов спустя 3.5–4 и 7 мес. со времени закладки клубней на низкотемпературное хранение предположительно является свидетельством периода физиологического покоя. Показанное изменение суммарного содержания каротиноидов при длительном холодном хранении

указывает на возможную зависимость данного параметра от генотипа сорта.

Таким образом, в работе впервые была определена динамика изменения уровня транскриптов большинства генов каротиногенеза в процессе длительного холодного хранения клубней, что существенно дополняет известные данные по экспрессионному ответу этих генов на низкотемпературный стресс. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований процессов, происходящих в клубнях картофеля при хранении, например для поиска корреляций содержания конкретных каротиноидов с экспрессией генов соответствующих этапов пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма “Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации”).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Howitt C.A., Pogson B.J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues // *Plant, Cell and Environment*. 2006. V. 29. P. 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x>
2. Lopez A.B., Van Eck J., Conlin B.J. et al. Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 2. P. 213–223. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm299>
3. Wurtzel E.T. Chapter five genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis // *Recent Adv. Phytochemistry*. 2004. V. 38. P. 85–110. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(04\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(04)80006-6)
4. Brown C.R., Culley C., Yang C.P. et al. Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines // *J. Am. Soc. Horticultural Sci.* 2005. V. 130. P. 174–180. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.174>
5. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // *Subcell. Biochem.* 2016. V. 79. P. 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
6. Dhar M.K., Mishra S., Bhat A. et al. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism // *Brief Funct. Genomics*. 2020. V. 19. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz037>
7. Huang X., Shi H., Hu Z. et al. ABA is involved in regulation of cold stress response in Bermudagrass // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01613>

8. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 165–185.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
9. Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 651–679.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
10. Fujisawa M., Watanabe M., Choi S.K. et al. Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene *crtB* // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. № 6. P. 636–641.
<https://doi.org/10.1263/jbb.105.636>
11. Maass D., Arango J., Wüst F. et al. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels // *PLoS One.* 2009. V. 4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006373>
12. Naqvi S., Zhu C., Farre G. et al. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways // *PNAS.* 2009. V. 106. № 19. P. 7762–7767.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901412106>
13. Ampomah-Dwamena C., Tomes S., Thrimawithana A.H. et al. Overexpression of *PSYI* increases fruit skin and flesh carotenoid content and reveals associated transcription factors in apple (*Malus × domestica*) // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967143>
14. Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A. et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner // *PNAS.* 2002. V. 99. № 2. P. 1092–1097.
<https://doi.org/10.1073/pnas.241374598>
15. Ducreux L.J., Morris W.L., Hedley P.E. et al. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. № 409. P. 81–89.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri016>
16. Diretto G., Tavazza R., Welsch R. et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase // *BMC Plant Biol.* 2006. V. 6.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-13>
17. Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification // *Science.* 2008. V. 319. № 5861. P. 330–333.
<https://doi.org/10.1126/science.1150255>
18. Yu B., Lydiate D.J., Young L.W. et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. № 4. P. 573–585.
<https://doi.org/10.1007/s11248-007-9131-x>
19. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F. et al. Molecular characterization of 5' UTR of the *lycopen epsilon cyclase* (*lycE*) gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification // *3 Biotech.* 2018. V. 8. № 1.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1100-y>
20. Zhu K., Zheng X., Ye J. et al. Building the synthetic biology toolbox with enzyme variants to expand opportunities for biofortification of provitamin A and other health-promoting carotenoids // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. № 43. P. 12048–12057.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04740>
21. Ye X., Al-Babili S., Klöti A. et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm // *Science.* 2000. V. 287. № 5451. P. 303–305.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>
22. Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 4. P. 482–487.
<https://doi.org/10.1038/nbt1082>
23. D'Ambrosio C., Giorio G., Marino I. et al. Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato *lycopen beta-cyclase* (*tlcy-b*) cDNA // *Plant Science.* 2004. V. 166. P. 207–214.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.09.015>
24. Gerjets T., Sandmann G. Ketocarotenoid formation in transgenic potato // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. № 14. P. 3639–3645.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl103>
25. Arnoux P., Morosinotto T., Saga G. et al. A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* 2009. V. 21. № 7. P. 2036–2044.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.068007>
26. Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J. et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling // *Plant Cell.* 2003. V. 15. № 4. P. 939–951.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010538>
27. Tran B.Q., Tran L.H., Kim S.J. et al. Altered regulation of porphyrin biosynthesis and protective responses to acifluorfen-induced photodynamic stress in transgenic rice expressing *Bradyrhizobium japonicum* Fe-chelatase // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019. V. 159. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.017>
28. Zita W., Bressoud S., Glauser G. et al. Chromoplast plastoglobules recruit the carotenoid biosynthetic pathway and contribute to carotenoid accumulation during tomato fruit maturation // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277774>
29. Zhang Y.M., Wu R.H., Wang L. et al. Plastid diversity and chromoplast biogenesis in differently coloured carrots: role of the *DcOR3^{Leu}* gene // *Planta.* 2022. V. 256(6). Article 104.
<https://doi.org/10.1007/s00425-022-04016-9>
30. Lu S., Van Eck J., Zhou X. et al. The cauliflower *Org* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation // *Plant Cell.* 2006. V. 18. № 12. P. 3594–3605.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.046417>
31. Sierra J., McQuinn R.P., Leon P. The role of carotenoids as a source of retrograde signals: Impact on plant devel-

- opment and stress responses // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73. № 21. P. 7139–7154.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac292>
32. *Eltawil M.A., Samuel D.K., Singhal O.P.* Potato storage technology and store design aspects // *Agricultural Engineering Intern.: CIGR J.* 2006. V. VIII. № 11. P. 1–18.
 33. *Brown C.R., Edwards C.G., Yang C.P. et al.* Orange flesh trait in potato – inheritance and carotenoid content // *J. Am. Soc. Horticultural Science.* 1993. V. 118. P. 145–150.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.118.1.145>
 34. *Payyavula R.S., Navarre D.A., Kuhl J.C. et al.* Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. 39.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-39>
 35. *Fogelman E., Oren-Shamir M., Hirschberg J. et al.* Nutritional value of potato (*Solanum tuberosum*) in hot climates: anthocyanins, carotenoids, and steroidal glycoalkaloids // *Planta.* 2019. V. 249. № 4. P. 1143–1155.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-03078-y>
 36. *Haider M.W., Nafees M., Ahmad I. et al.* Postharvest dormancy-related changes of endogenous hormones in relation to different dormancy-breaking methods of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.945256>
 37. *Wiberley-Bradford A.E., Busse J.S., Jiang J. et al.* Sugar metabolism, chip color, invertase activity, and gene expression during long-term cold storage of potato (*Solanum tuberosum*) tubers from wild-type and vacuolar invertase silencing lines of Katahdin // *BMC Res. Notes.* 2014. V. 7. Article 801.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-801>
 38. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V. et al.* Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9. № 9.
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
 39. *Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V. et al.* Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes // *Rus. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1054–1062.
<https://doi.org/10.31857/S0015330320050048>
 40. *Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E.* Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress // *Mol. Breeding.* 2013. V. 31. № 1. P. 39–45.
<https://doi.org/10.1007/s11032-012-9766-z>
 41. *Tang X., Zhang N., Si H. et al.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // *Plant Methods.* 2017. V. 13. № 85.
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0238-7>
 42. *Nesterenko S., Sink K.C.* Carotenoid profiles of potato breeding lines and selected cultivars // *Hortscience.* 2003. V. 38. P. 1173–1177.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1173>
 43. *Morris W.L., Ducreux L., Griffiths D.W. et al.* Carotenogenesis during tuber development and storage in potato // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 399. P. 975–982.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh121>
 44. *Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O. et al.* A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 5036–5039.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42724-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42724-X)
 45. *Bartley G.E., Scolnik P.A.* cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 25718–25721.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74448-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74448-2)
 46. *Pasare S., Wright K., Campbell R. et al.* The sub-cellular localisation of the potato (*Solanum tuberosum* L.) carotenoid biosynthetic enzymes, CrtRb2 and *PSY2* // *Protoplasma.* 2013. V. 250. № 6. P. 1381–1392.
<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0521-z>
 47. *Stauder R., Welsch R., Camagna M. et al.* Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE SYNTHASE* gene family // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00255>
 48. *Naing A.H., Kim C.K.* Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses // *Physiol. Plant.* 2021. V. 172. № 3. P. 1711–1723.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13373>
 49. *Destefano-Beltrán L., Knauber D., Huckle L. et al.* Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 61. № 4-5. P. 687–697.
<https://doi.org/10.1007/s11103-006-0042-7>
 50. *Welsch R., Zhou X., Yuan H. et al.* Clp protease and OR directly control the proteostasis of phytoene synthase, the crucial enzyme for carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. № 1. P. 149–162.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.003>
 51. *Osorio C.E.* The role of *Orange* gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01235>
 52. *Tzuri G., Zhou X., Chayut N. et al.* A ‘golden’ SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*) // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 267–279.
<https://doi.org/10.1111/tjpi.12814>
 53. *Yuan H., Owsiany K., Sheeja T.E. et al.* A single amino acid substitution in an *ORANGE* protein promotes carotenoid overaccumulation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. № 1. P. 421–431.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00971>

Таблица S1. Значения коэффициентов корреляции Пирсона (r) и множественной корреляции (R^2), а также p -value, полученные при оценке зависимости суммарного содержания каротиноидов от уровней экспрессии отдельных генов пути биосинтеза каротиноидов в клубнях сортов картофеля при длительном холодном хранении

| Коэффициент | <i>PDS</i> | <i>CRTISO</i> | <i>LCYB1</i> | <i>LCYB2</i> | <i>PSY1</i> | <i>PSY2</i> | <i>PSY3</i> | <i>NSY</i> | <i>VDE</i> | <i>ZDS</i> | <i>ZEP</i> | <i>Z-ISO</i> | <i>LCYE</i> | <i>NCED1</i> | <i>NCED2</i> | <i>NCED6</i> |
|-------------|------------|---------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| r | 0.52 | 0.08 | 0.07 | 0.12 | 0.23 | 0.11 | 0.16 | 0.06 | -0.01 | 0.15 | -0.02 | -0.05 | 0.37 | 0.23 | 0.08 | 0.21 |
| R^2 | 0.27 | 0.007 | 0.005 | 0.015 | 0.055 | 0.013 | 0.027 | 0.003 | <0.0001 | 0.022 | <0.0004 | 0.003 | 0.14 | 0.053 | 0.006 | 0.044 |
| p -value | 0.047 | 0.763 | 0.806 | 0.654 | 0.399 | 0.683 | 0.559 | 0.834 | 0.97 | 0.594 | 0.943 | 0.846 | 0.169 | 0.408 | 0.78 | 0.453 |

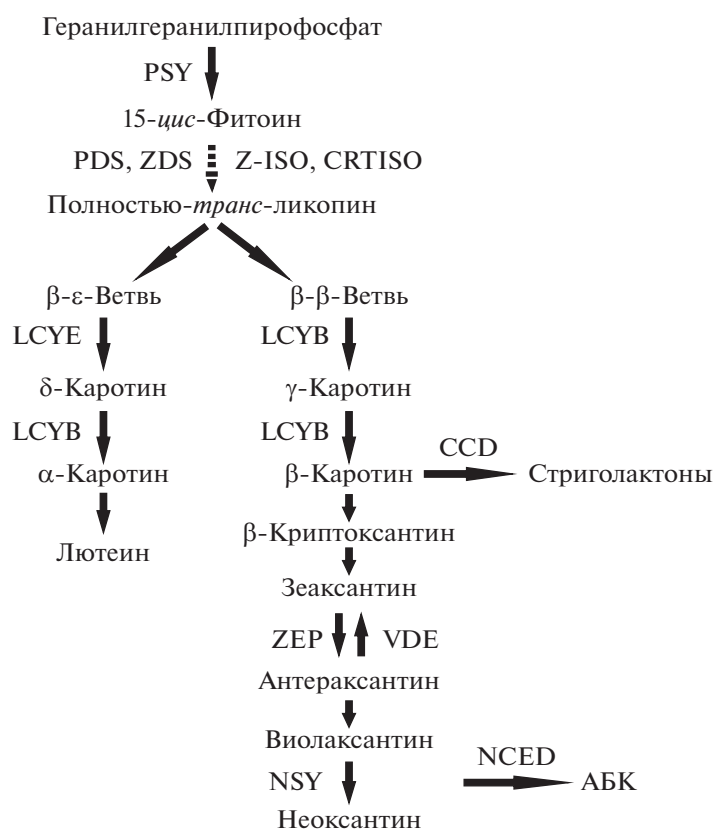


Рис. S1. Схематическое изображение пути биосинтеза каротиноидов. Фитоинсинтаза (PSY) катализирует конденсацию двух молекул геранилгеранилпирофосфата (GGPP) в 15-цис-изомер фитоина (бесцветен). Далее четыре последовательные реакции десатурации и изомеризации приводят к образованию ликопина (красный). Первые две десатурации катализируются фитоиндесатуразой (PDS) и последние две – ζ-каротиндесатуразой (ZDS). 15-цис-ζ-Каротинизомераза (Z-ISO) и каротиноид-цис-транс-изомераза (CRTISO) катализируют цис-транс-превращение продукта PDS в субстрат для ZDS и поли-цис-ликопина в транс-ликопин соответственно. Дальнейшая циклизация ликопина представляет собой первую точку ветвления каротиногенного пути. Ликопин-β-циклаза (LCYB) и ликопин-ε-циклаза (LCYE) конкурируют за ликопин в качестве субстрата, что приводит к каротиноидам либо с β/β-, либо с ε/β-иононовыми кольцами. Фермент LCYB катализирует циклизацию одного конца линейной молекулы ликопина с образованием γ-каротина и далее формирование второго β-кольца с образованием β-каротина. LCYE вводит одно ε-кольцо в ликопин с образованием δ-каротина, а последующая циклизация с помощью LCYB генерирует α-каротин. Из α- и β-каротина образуются ксантофиллы: лютеин (ε,β-ветвь) и зеаксантин (β,β-ветвь). Зеаксантин эпоксируется зеаксантинэпоксидазой (ZEP), что приводит к синтезу антраксантина, виолаксантина и неоксантина; обратная реакция осуществляется виолаксантиндеэпоксидазой (VDE). Виолаксантин с помощью неоксантинсинтазы (NSY) превращается в неоксантин [5]. β,β-Каротиноиды могут расщепляться до апокаротиноидов (абсцизовой кислоты (АБК) или стриголактонов) с помощью каротиноид-расщепляющих диоксигеназ [6]. Так, первую стадию пути биосинтеза АБК специфически катализируют 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (NCED) с использованием 9-цис-виолаксантина и 9-цис-неоксантина в качестве субстратов [8, 9]. В схеме указаны ферменты, гены которых использованы в настоящей работе.



Рис. S2. Фотографии клубней (целиком и в разрезе): *S. tuberosum* сорта Барин (каталожный номер в Госсортреестре – 8854151; <https://teestr.gossortrf.ru/>; кожура светло-бежевая, мякоть светло-желтая), Утро (9253216; кожура светло-бежевая, мякоть светло-желтая), Красавчик (9553926; кожура красная, мякоть светло-кремовая), Северное сияние (8558886; кожура синяя, мякоть сине-пестрая), Надежда (9463920; кожура светло-бежевая, мякоть кремовая).

The Content of Carotenoids and the Expression Profile of Carotenoid Biogenesis Genes during Long-Term Cold Storage of Potato Tubers

A. M. Kulakova^a, *, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^aInstitute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Carotenoids are secondary metabolites that are synthesized and stored in all types of plant plastids. These pigments play a significant role in protection against oxidative stress, as well as in the color of flowers and sink organs. Tubers of potato *Solanum tuberosum* L. synthesize carotenoids, including during post-harvest storage. The state of physiological dormancy and cold stress response are controlled, among other things, by abscisic acid (ABA), which is an apocarotenoid. In this study, we analyzed the expression of carotenoid biogenesis pathway genes (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2*, and *NCED6*), as well as genes putatively involved in initiation of chromoplast differentiation (*OR1* and *OR2*), in the dynamics of long-term cold storage (September, February, April) of tubers of potato cultivars Barin, Utro, Krasavchik, Sevemoe siyanie and Nadezhda. It was shown that *OR1*, and *OR2* mRNAs are present in tubers of all cultivars at all stages of storage. The expression profile of all analyzed carotenoid biosynthesis genes during tuber storage was characterized by a significant decrease in transcript levels in February compared to September, with some exceptions. In the period from February to April, the level of gene transcripts changed insignificantly. The biochemical analysis of the carotenoid content in the dynamics of cold storage showed that at the time of harvesting, the highest carotenoid content was in tubers of the cv. Utro; tubers of other cultivars were characterized by a similar amount of carotenoids. During storage from September to April, the total carotenoids changed in a genotype-dependent manner without any trend common to all cultivars.

Keywords: *Solanum tuberosum*, potato cultivars, tuber storage, carotenoid biosynthesis, chromoplasts, gene expression.