

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГДФ-L-ГАЛАКТОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (*ApGGP1*) У СОРТОВ ЛУКА-ПОРЕЯ

© 2021 г. О. К. Анисимова¹, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹, М. А. Филюшин¹, *

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 01.05.2020 г.

После доработки 02.06.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

У широкой выборки сортов лука-порей *Allium porrum* L., различающихся содержанием витамина С, идентифицированы и охарактеризованы кодирующие последовательности гена *ApGGP1*, продукт которого – ГДФ-L-галактозофосфорилаза – является ключевым ферментом L-галактозного пути биосинтеза витамина С. Определен аллельный полиморфизм кДНК гена *ApGGP1* у 35 сортов лука-порей, выявлено 29 аллельных вариантов, соответствующих 11 вариантам белка *ApGGP1*. В последовательностях *ApGGP1* у лука-порей и других видов *Allium* выявлен родоспецифичный С-концевой мотив (50 а. о.). Определен профиль экспрессии гена *ApGGP1* в различных органах и тканях (корень, донце, отбеленная часть ложного стебля и зеленый лист (молодой и зрелый)) лука-порей. Транскрипты *ApGGP1* присутствуют во всех анализируемых тканях. Максимальный уровень экспрессии гена наблюдается в листьях, минимальный – в донце. При этом в корнях (нефотосинтезирующая ткань) уровень экспрессии гена достаточно высок и сопоставим с таковым в молодых листьях.

Ключевые слова: лук-порей, *Allium porrum*, ГДФ-L-галактозофосфорилаза, полиморфизм гена, профиль экспрессии.

DOI: 10.31857/S0016675821030036

L-аскорбиновая кислота (АК, аскорбат, витамин С) является важным элементом неферментативной антиоксидантной системы эукариот – растений и животных [1, 2]. Также АК вовлечена в процессы клеточного роста и деления и является субстратом для синтеза других соединений и кофактором некоторых ферментов [1, 3]. При этом ряд животных, включая приматов, не способны синтезировать АК, так как потеряли функциональный ген, кодирующий последний фермент в пути биосинтеза АК, и получают необходимые количества витамина С с пищей [1].

В растениях витамин С был обнаружен во всех клеточных структурах, включая митохондрии, где происходит последняя стадия биосинтеза АК [1]. Содержание АК значительно варьируется в разных тканях и наибольшее количество характерно для фотосинтезирующих листьев, меристем, цветков и незрелых плодов, а наименьшее – для стеблей и корней [1, 4].

К настоящему времени описаны четыре основных пути биосинтеза АК – L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый [1, 5]. Основным в растениях считается L-галактозный путь Смирнова–Уилера (Smirnoff-Wheeler), который начинается с образования ГДФ-D-маннозы, поэтапно преобразуемой в производные L-галактозы вплоть до синтеза конечного продукта – L-аскорбиновой кислоты [1, 6]. Ключевым ферментом L-галактозного пути является ГДФ-L-галактозофосфорилаза (GDP-L-galactose phosphorylase, GGP; EC 2.7.7.69), катализирующая второй этап биосинтеза – превращение ГДФ-L-галактозы в L-галактозу-1-Р [1, 7].

ГДФ-L-галактозофосфорилаза кодируется геном *GGP*, последовательности которого идентифицированы у многих видов растений [5, 6, 8, 9]. При этом геном растений может содержать несколько паралогичных генов, кодирующих изоформы данного фермента. Например, у *Arabidopsis thaliana* идентифицировано два гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы – *VITAMIN C (VTC) 2* и

VTC5, однако вклад этих генов в процесс биосинтеза АК значительно различается: *VTC2* играет преобладающую роль, а *VTC5* – дополняющую [8, 9]. У *Triticum aestivum* в каждом из трех субгеномов найдено по два гена ГДФ-Л-галактозофосфоорилазы (*TaGGP1-A/B/D* и *TaGGP2-A/B/D*), профили экспрессии которых сильно различаются, что может означать участие отдельных изоформ (с преобладающим влиянием *TaGGP1*) в биосинтезе АК в конкретных тканях и органах мягкой пшеницы [6].

Лук-порей (*Allium porrum* L.) является популярной овощной культурой в Западной Европе и Азии, а в последнее время и в РФ. В пищу пригодны практически все растение – отбеленный ложный стебель и зеленые листья. Аскорбиновая кислота вносит значительный вклад в антиоксидантную активность лука-порея, причем в зеленых листьях содержание АК значительно больше, чем в отбеленной части, и может достигать 8.5 мг/г сухой массы [10]. На видах и сортах *Allium* регулярно проводятся сравнительные исследования, касающиеся анализа антиоксидантной активности и содержания АК [10]. Несмотря на это, ни генные сети, ни отдельные гены пути биосинтеза АК до сих пор не охарактеризованы ни у лука-порея, ни у других представителей рода *Allium*.

Целью данной работы стала идентификация у лука-порея кодирующей последовательности, гомологичной гену *GGP1*, исследование ее межсортовой вариативности и аллельного полиморфизма и определение профиля экспрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы были отобраны 35 сортов лука-порея зарубежной и отечественной селекции из коллекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО) (табл. в Приложении). Из зеленых листьев этих сортов была выделена суммарная РНК с очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; QIAGEN), синтезированы препараты кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega).

С целью амплификации *GGP1*-последовательностей у анализируемых образцов лука-порея были разработаны специфичные праймеры. В базе транскриптомных данных (NCBI TSA) у представителей рода *Allium* был проведен поиск последовательностей, гомологичных кДНК гена *GGP1 Asparagus officinalis* (XM_020388507.1). Были найдены гомологичные транскрипты у *A. ampeloprasum* (GFAR01020967.1), *A. cepa* (GBGJ01076064.1) и *A. sativum* (GFAR01091649.1),

на основе которых разработаны праймеры (ApVTC2F 5'-GTTCTCCTTCCGATTTGCT-3' и ApVTC2R 5'-ATTCCATARATACTGACTTCAG-3') для амплификации полноразмерной кодирующей последовательности (включая 70–100 пн 5'- и 3'-UTR) гомолога гена *GGP1* у образцов *A. porrum*.

С помощью разработанных праймеров на препаратах кДНК амплифицировали последовательности гомолога гена *GGP1*. ПЦР-продукты ожидаемой длины были очищены с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN, Германия) и секвенированы с использованием тех же праймеров на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН). Выравнивание и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей был проведен с помощью программы MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Консервативные домены и мотивы в белках были определены с помощью NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков было предсказано с помощью программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Профиль экспрессии гена *GGP1* был определен методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) в корнях, донце, зеленых листьях (молодой и зрелый) и отбеленной части ложного стебля (поперечный срез шириной 0.5 см в 2 см от донца) растений лука-порея сорта Премьер (собраны в августе 2019 г. на стадии активного формирования отбеленного ложного стебля). Для РВ-ПЦР были разработаны специфичные праймеры rVTC2F 5'-GGTGTCAAGCGTGTGTATCTG-3' и rVTC2R 5'-TTCCCAAACAGCGGGATTGAC-3'. Относительный уровень экспрессии *GGP1* был определен по референсным генам *GAPDH* [11] и *UBQ* [12]. Для РВ-ПЦР был использован набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторях в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кодирующие последовательности гомолога гена *GGP1* были амплифицированы и секвенированы у 35 сортов лука-порея. Полученные после-

Таблица 1. Аллельный полиморфизм кодирующих последовательностей гена *GGP1* у анализируемых сортов лука-порея. Положение SNP на кДНК определено от старт-кодона

Сорт	64	109	167	171	213	234	351	390	597	648	774	807	858	982	987	1023	1026	1059	1077	1093	1110	1191	1216	1243	1249	Аллель
Lyon	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A1
American flag	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Prazal	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Praza 2	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Agria	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A2
Monstruoso-2	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Элефант	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A3
Летний бриз	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Herfstreuzen	G	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A4
Amarillo	G	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	
Monstruoso-1	G	C	G	G	C	C	T	A	T	C	C	A	C	C	C	T	C	A	C	G	C	C	C	G	G	A5
Olifant-Exelsior	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	T	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A6
Long d'hiver	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	C	C	G	G	A7
Poireau	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	C	C	G	G	A8
Giant aneliore	G	C	C	A	C	C	T	A	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A9
Musselburgh	G	C	G	G	C	A	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	C	C	G	G	A10
Empire	A	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A11
Itation gent	G	C	G	G	C	C	T	A	T	A	C	G	C	T	C	C	T	A	C	G	C	T	C	G	G	A12
Blauwgroene Winter	G	C	C	A	C	C	A	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	T	C	G	G	A13	
Коламбу	G	C	G	G	C	C	G	T	C	C	A	C	C	C	C	T	C	A	C	C	C	T	A	G	T	A14
Голиаф	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	T	C	G	G	A15
Жираф	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	A	T	C	A	C	G	C	C	A	G	G	A16
Казимир	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	A	C	G	C	T	C	G	G	A17
Слон	A	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	T	A18
Хобот слона	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	A	C	G	C	C	C	G	G	A19
Добрый молодец	G	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	A	T	C	A	T	G	C	C	C	G	T	A20
Карантанский	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	G	A21
Porree dicker	G	C	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	T	C	G	C	T	C	T	T	A22	
Прас	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	T	C	G	G	A23
Otina	G	C	C	A	T	C	C	A	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	G	C	T	C	C	G	G	A24
Pandora	G	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	A	C	G	C	C	C	G	G	A25
Веста	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	C	T	C	G	T	A26
Аллигатор	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	T	C	C	T	A	C	G	C	T	C	G	T	A27
Премьер	G	C	C	A	C	C	T	G	T	C	C	A	A	T	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	A28
XXL	G	C	C	G	C	C	T	G	T	C	C	A	C	C	C	T	C	T	C	G	T	C	C	G	G	A29

довательности были депонированы в NCBI (MT479049–MT479083).

Размер кДНК *ApGGP1* у всех образцов *A. porrum* был инвариантен и составил 1275 пн, как и у других видов *Allium* (*A. ampeloprasum*, *A. sativum* и *A. cepa*). В сравнении с *GGP1 A. sativum* и *A. cepa* в последовательностях *ApGGP1* образцов лука-порея было выявлено 23 и 57 SNPs соответственно. Последовательности *GGP1 A. ampeloprasum* и образцов *A. porrum* различались всего одной нуклеотидной заменой (A675T), что было ожидаемо, так как *A. porrum* согласно ряду таксономических классификаций считается подвидом *A. ampeloprasum* [13].

Размер кДНК *GGP1* аспарагуса *A. officinalis* (1320 пн) оказался больше размера кодирующей последовательности *GGP1 A. porrum*, а гомология составила 79.8%. Поскольку структурное сход-

ство высоко, то вероятно, что подобно *GGP1 A. officinalis* полногеномная последовательность *GGP1 A. porrum* также содержит шесть экзонов.

В идентифицированных последовательностях кДНК *GGP1* сортов лука-порея было выявлено 25 вариабельных сайтов (1.96% от общей длины кДНК). Почти половина SNPs (12) находятся на 3'-конце кДНК (предположительно экзон VI). Для анализируемой выборки 11 SNPs – образец-специфичны: C109G, C213T и T597C (сорт Otina), C234A (Musselburgh), C648A и A807G (Itation gent), C774T (Olifant-Exelsior), C858A (Премьер), C1077T (Добрый молодец), C1110T (XXL), G1243T (Porree dicker). Остальные нуклеотидные замены встречаются у двух и более сортов лука-порея (табл. 1).

Проведенный анализ позволил выявить 29 аллельных вариантов *GGP1*, различающихся комбина-

циями SNPs у анализируемых сортов лука-порей (табл. 1). Аллельный вариант A1 идентифицирован у четырех сортов лука-порей, аллели A2, A3 и A4 встречаются у пар сортов – *Agria/Monstruoso-2*, *Элефант/Летний бриз* и *Herfstreuzen/Amarillo* соответственно (табл. 1). Остальные аллельные варианты сортоспецифичны для данной выборки. Наибольшее количество нуклеотидных замен по сравнению с аллелем A1 обнаружено у вариантов A12 (сорт *Itation gent*), A20 (*Добрый молодец*) и A24 (*Otina*).

Так как взятые в анализ сорта лука-порей различались содержанием витамина С (табл. в Приложении), была проведена оценка возможных ассоциаций между содержанием АК и выявленными нуклеотидными заменами. Для этого сравнивали SNPs, общие для групп сортов с высоким (>35 мг/100 г) или низким (<30 мг/100 г) содержанием витамина С. Однако каких-либо корреляций выявлено не было.

Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы. Размер белка GGP1 был инвариантным (424 а. о.) у всех исследуемых сортов лука-порей. Идентифицированные в кДНК несинонимичные замены приводят к семи замещениям а. о. (E22K, P37A, S56C, A365P, R406S, A415S и A417S), анализ которых в программе PROVEAN предсказал их нейтральный характер. Замещение S56C присутствует у 12 сортов выборки, а замещения E22K, A365P, R406S и A417S характерны для меньшего числа сортов (табл. 2). Два замещения были сортоспецифичными: P37A (сорт *Otina*) и A415S (*Pogree dicker*). Всего у анализируемых сортов лука-порей было выявлено 11 вариантов белка ApGGP1, характеризующихся различными комбинациями замещений а. о. (табл. 2). Вариант белка P1 присутствует у 17 сортов лука-порей (48.5%), P2 – у восьми (22.8%), P3 – у двух (5.7%), а P4–P11 – у отдельных сортов.

Анализ последовательностей с помощью NCBI-CDD показал, что все они содержат консервативный домен ГДФ-Л-галактозогексозо-1-фосфат-гуанилтрансферазы (PLN03103) в положении 1–393 а. о. Последовательности домена у GGP1 лука-порей оказались высоко гомологичны таковым у других видов растений, например аспарагуса *A. officinalis* (идентичность 80%) или томата *Solanum lycopersicum* (73%). В домене PLN03103 GGP1 анализируемых образцов *A. porrum* было выявлено четыре нейтральных замещения а. о. (E22K, P37A, S56C и A365P) (табл. 2).

ГДФ-Л-галактозофосфорилаза относится к суперсемейству белков HINT (histidine triad nu-

cleotide protein), которые характеризуются схожей структурой и наличием гистидиновой триады His-X-His-X-His-X-X, являющейся каталитическим центром фермента [14]. Как было показано ранее, у растений в белках ГДФ-Л-галактозофосфорилазы отсутствует третий остаток гистидина [8, 15]. В анализируемых последовательностях белков ApGGP1 был выявлен мотив HLHFQ (233–237 а. о.). Такой же мотив содержат белки GGP1 *A. thaliana*, томата *S. lycopersicum*, пшеницы *T. aestivum* и других видов растений [6, 15, 16]. Ранее было показано, что у *A. thaliana* и томата *S. lycopersicum* белки GGP локализируются в цитоплазме и ядре и предположительно имеют двойную функцию, ферментативную и регуляторную [17, 18]. Сигнал ядерной локализации KKRP, найденный в белках GGP других видов растений [6], также был обнаружен и в последовательностях белков GGP1 анализируемых образцов лука-порей. Это позволяет предположить, что GGP1 у лука-порей также может иметь двойную функцию.

Идентифицированные варианты аминокислотных последовательностей ApGGP1 анализируемых сортов лука-порей были использованы для кластерного анализа. На построенной дендрограмме все выявленные варианты белка P1–P11 формируют единую группу с *A. ampeloprasum* (бутстрепп-поддержка 89%). Базальные ветви образуют другие виды *Allium* (*A. cepa* и *A. sativum*) и спаржа *A. officinalis*. Таким образом, все взятые в анализ виды порядка Asparagales формируют общий субкластер (бутстрепп-поддержка 99%). Другие виды однодольных растений, рис *Oryza sativa* и ананас *Ananas comosus* (порядок Poales) формируют ветви к субкластеру видов Asparagales. Виды двудольных растений ожидаемо образуют субкластеры, генетически отдаленные (*p*-distance 0.30–0.35) от группы видов Asparagales (рис. 1,а).

С помощью программы MEME 5.1.1 в последовательностях ApGGP1 были достоверно идентифицированы 14 консервативных мотивов, десять из которых присутствовали в белках GGP1 всех взятых в анализ видов растений (рис. 1,б). Мотив 11 был выявлен в последовательностях белков GGP1 только у представителей порядка Asparagales: лука-порей *A. porrum* (55–69 а. о.), других видов *Allium* (55–69 а. о.) и аспарагуса *A. officinalis* (62–76 а. о.). С-концевой мотив 7 (375–424 а. о.) был специфичным только для GGP1 видов *Allium* (рис. 1,б). Интересно, что все три С-концевых замещения а. о., обнаруженных в ApGGP1 анализируемых сортов лука-порей, локализованы именно в мотиве 7. Другие замещения а. о., находящиеся в функциональном домене PLN03103, локализова-

Таблица 2. Вариабельность аминокислотных последовательностей GGP1 у анализируемых 35 сортов лука-порея

Сорт	Замещения аминокислотных остатков							Вариант белка	
	E22K	P37A	S56C	A365P	R406S	A415S	A417S		
	Домен PLN03103								
Lyon	E	P	S	A	R	A	A	P1	
American flag	E	P	S	A	R	A	A		
Olifant-Exelsior	E	P	S	A	R	A	A		
Long d'hiver	E	P	S	A	R	A	A		
Poireau	E	P	S	A	R	A	A		
Giant anelioro	E	P	S	A	R	A	A		
Praza 1	E	P	S	A	R	A	A		
Plaza 2	E	P	S	A	R	A	A		
Herfstreuzen	E	P	S	A	R	A	A		
Amarillo	E	P	S	A	R	A	A		
Blauwgroene Winter	E	P	S	A	R	A	A		
Казимир	E	P	S	A	R	A	A		
Хобот слона	E	P	S	A	R	A	A		
Добрый молодец	E	P	S	A	R	A	A		
Прас	E	P	S	A	R	A	A		
Pandora	E	P	S	A	R	A	A		
XXL	E	P	S	A	R	A	A		
Monstruoso-1	E	P	C	A	R	A	A		P2
Monstruoso-2	E	P	C	A	R	A	A		
Musselburgh	E	P	C	A	R	A	A		
Itation gent	E	P	C	A	R	A	A		
Agria	E	P	C	A	R	A	A		
Голиаф	E	P	C	A	R	A	A		
Летний бриз	E	P	C	A	R	A	A		
Элефант	E	P	C	A	R	A	A		
Карантанский	E	P	S	A	R	A	S	P3	
Веста	E	P	S	A	R	A	S		
Жираф	E	P	C	A	S	A	A	P4	
Коламбус	E	P	C	P	S	A	S	P5	
Аллигатор	E	P	C	A	R	A	S	P6	
Премьер	E	P	S	P	R	A	A	P7	
Porree dicker	E	P	S	A	R	S	S	P8	
Otina	E	A	S	A	R	A	A	P9	
Empire	K	P	S	A	R	A	A	P10	
Слон	K	P	C	A	R	A	S	P11	

ны в мотивах 2 (A365P), 6 (P37A) и 11 (S56C), а замещение E22K – между мотивами 9 и 6.

С учетом того, что гены изоформ GGP могут обладать органо- и тканеспецифичной транскрипцией [5, 6], был проведен анализ профиля экспрессии гена *ApGGP1* в различных органах (корень, донце, зеленый лист (молодой и зрелый) и отбеленная часть ложного стебля) лука-порей отечественного сорта Премьер (рис. 1, в). Транскрипты *ApGGP1* присутствовали во всех анализируемых тканях. Максимальный уровень экспрессии *ApGGP1* наблюдается в зрелых зеленых листьях лука-порея, тогда как в молодых листьях уровень транскрипции данного гена ниже в 1.5 раза (рис. 1, в). Полученные данные согласуются с результатами других исследований, где наиболее высокая экспрессия *GGP1* также детектируется в фотосинтезирующих тканях [17, 19]. Считается, что это может быть связано с наличием в промоторе гена *GGP1*, как и в промоторах некоторых других генов L-галактозного пути биосинтеза АК, светочувствительных cis-элементов [20, 21].

Что касается нефотосинтезирующих тканей лука-порея, то в донце (уплощенный стебель видоизмененного побега) был выявлен минимальный уровень транскрипции *ApGGP1*, в 14.6 раз ниже, чем в зрелых зеленых листьях, а в отбеленной части ложного стебля – в 1.5 и 2 раза ниже, чем в молодых и зрелых листьях соответственно. Можно предположить, что транскрипция гена *GGP1* в нефотосинтезирующих тканях связана с необходимостью синтеза в них витамина С для инактивации возникающих в процессе метаболизма активных форм кислорода [2]. Ранее считалось, что транскрипция гена *GGP1* активируется наличием света, поэтому максимальные уровни экспрессии наблюдаются в активно фотосинтезирующих органах [20]. Полученные данные соответствуют результатам других исследований, где, как и в случае анализируемых нами сортов лука-порея, нефотосинтезирующим тканям соответствуют минимальные уровни экспрессии *GGP1* [6, 17]. Например, в корнях *A. thaliana* уровень экспрессии гена *VTC2* (гомолог *GGP1*) в 18 раз ниже, чем в листьях [17]. У баклажана (*Solanum melongena*) в корнях уровень транскрипции *GGP1* также минимальный [22].

Интересно, однако, что в нашем исследовании в корнях лука-порея уровень транскрипции *ApGGP1* сопоставим с таковым в молодом зеленом листе (рис. 1, в). Это подтверждает возможность участия АК в ответе корней растений на различные абиотические стрессы. Так, ранее было показано, что в ответ на солевой стресс в корнях *O. sativa* индуцируется биосинтез АК, что сопровождается ростом

экспрессии одного из ключевых генов биосинтеза АК (*OsVTC1-3*), а подавление экспрессии этого гена значительно нарушает устойчивость риса к солевому стрессу [23].

Выявленный у сортов лука-порея высокий нуклеотидный полиморфизм гена *ApGGP1* может быть следствием высокого уровня внутривидового геномного полиморфизма, характерного для *A. porrum* [24, 25]. Однако значительное структурное сходство белковых последовательностей *ApGGP1* у сортов лука-порея и отсутствие радикальных замен, в особенности в домене PLN03103 и каталитическом центре, позволяют предположить, что гомологи *GGP1* сохраняют функцию и уровень ферментативной активности в биосинтезе АК у анализируемых образцов *A. porrum*, косвенно подтверждая значимость витамина С для развития растения и реакции на стрессы [7].

Поскольку исследуемый ген *GGP1* кодирует ключевой фермент L-галактозного пути биосинтеза АК, мы предполагали возможность существования корреляций между вариабельностью *ApGGP1* и содержанием витамина С в тканях лука-порея. Однако таких корреляций обнаружено не было. По всей видимости, при оценке подобных зависимостей, кроме скорости катаболизма АК, растущей под влиянием окислительного стресса, следует учитывать также возможность транспортировки АК по флоэме из фотосинтезирующих тканей в запасающие [1], в нашем случае в отбеленную часть ложного стебля. Таким образом, регуляция метаболизма аскорбиновой кислоты у вида *A. porrum* зависит не только от уровня экспрессии считающегося ключевым гена ГДФ-L-галактозофосфоорилазы, но является более сложным процессом и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 19-016-00054) и частично Министерства науки и высшего образования РФ (А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева), с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Использованные в работе сорта лука-поррея *A. porrum*

Сорт	Номер по кат. ФНЦО/ВИР/Госсортреестр (при наличии)	Происхождение	Содержание витамина С в белой части, мг/100 г сырой массы*
Monstruoso-1	К-1/2114	Аргентина	40
Lyon	К-2/2159	Великобритания	33
American flag	К-3/2191	Дания	36
Olifant-Exelsior	К-4/2196	Нидерланды	26
Long d'hiver	К-5/2212	Франция	37
Poireau	К-6/2231	Франция	25
Giant aneliore	К-7/2238	Нидерланды	27
Praza1	К-8/2244	Турция	33
Praza 2	К-9/2245	Италия	40
Monstruoso-2	К-10/2248	Великобритания	27
Musselburgh	К-11/2253	Нидерланды	24
Herfstreuzen	К-12/2270	Нидерланды	36
Amarillo	К-13/2307	Франция	29
Empire	К-14/2350	Дания	35
Itation gent	К-15/2353	Дания	34
Agria	К-16/2398	Нидерланды	35
Blauwgroene Winter	К-17/2403	Германия	44
Коламбус	К-26	Нидерланды	24
Голиаф	К-28	Россия	26
Жираф	К-29	Россия	н/а
Казимир	К-31	Германия	35
Летний бриз	К-33	Россия	26
Слон	К-36	Россия	30
Хобот слона	К-37	Россия	32
Добрый молодец	К-39	Россия	32
Карантанский	К-40/2001	Россия	26
Pogree dicker	К-41/2017	Германия	26
Прас	К-42/2038	Россия	24
Otina	К-89	Нидерланды	н/а
Pandora	К-101	Нидерланды	н/а
Веста	9102094	Россия	36
Аллигатор	9154083	Россия	н/а
Премьер	9705521	Россия	н/а
Элефант МС	9550224	Чехия	33
XXL		Россия	н/а

Примечание. * – по данным ФНЦО; н/а – не анализировалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smirnov N.* Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // *Free Radical Biol. Med.* 2018. V. 22. P. 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
2. *Bilska K., Wojciechowska N., Alipour S., Kalemba E.M.* Ascorbic acid-the little-known antioxidant in woody plants // *Antioxidants (Basel)*. 2019. V. 8. Article 645. <https://doi.org/10.3390/antiox8120645>
3. *Conklin P.L., Barth C.* Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to

- ozone, pathogens, and the onset of senescence // *Plant Cell Environ.* 2004. V. 27. P. 959–970.
4. *Gest N., Gautier H., Stevens R.* Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule? // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 33–53.
 5. *Broad R.C., Bonneau J.P., Hellens R.P., Johnson A.A.T.* Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants // *Intern. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Article 1790.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051790>
 6. *Broad R.C., Bonneau J.P., Beasley J.T. et al.* Genome-wide identification and characterization of the GDP-L-galactose phosphorylase gene family in bread wheat // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. № 1. Article 515.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2123-1>
 7. *Linster C.L., Clarke S.G.* L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: The role of VTC2 // *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. P. 567–573.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.08.005>
 8. *Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S. et al.* Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling // *Plant J.* 2007. V. 52. P. 673–689.
 9. *Gao Y., Badejo A.A., Shibata H. et al.* Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2011. V. 75. P. 1783–1788.
 10. *Bernaert N., De Paepe D., Bouten C. et al.* Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 669–677.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.159>
 11. *Liu M., Wu Z., Jiang F.* Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435–444.
<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0780-9>
 12. *Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F. et al.* The onion (*Allium cepa* L.) R2R3-MYB gene *MYB1* regulates anthocyanin biosynthesis // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 1865.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01865>
 13. *Hirschegger P., Jakse J., Trontelj P., Bohanec B.* Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010. V. 54. № 2. P. 488–497.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.030>
 14. *Brenner C.* Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 29. P. 9003–9014.
 15. *Hou H.M., Li H.E., Gao M. et al.* Expression of a GDP-L-galactose phosphorylase-like gene in a chinese wild *Vitis* species induces responses to erysiphe necator and defense signaling molecules // *Genet. Mol. Res.* 2013. V. 12. №3. P. 3830–3844.
<https://doi.org/10.4238/2013.September.23.1>
 16. *Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А.* Идентификация и анализ вариабельности генов-гомологов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты VTC2 у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) // *ДАН.* 2018. Т. 483. С. 682–686.
<https://doi.org/10.31857/S086956520003457-5>
 17. *Müller-Moulé P.* An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2 // *Plant Mol. Biol.* 2008. V. 68. P. 31–41.
<https://doi.org/10.1007/s11103-008-9350-4>
 18. *Wang L., Meng X., Yang D. et al.* Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress // *Plant Cell Rep.* 2014. V. 33. P. 1441–1451.
 19. *Huang M., Xu Q., Deng X.-X.* L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) // *J. Plant Physiol.* 2014. V. 171. P. 1205–1216.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.010>
 20. *Fukunaga K., Fujikawa Y., Esaka M.* Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2010. V. 74. P. 888–891.
<https://doi.org/10.1271/bbb.90929>
 21. *Li J., Liang D., Li M., Ma F.* Light and abiotic stresses regulate the expression of GDP-L-galactose phosphorylase and levels of ascorbic acid in two kiwifruit genotypes via light-responsive and stress-inducible cis-elements in their promoters // *Planta.* 2013. V. 238. P. 535–547.
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1915-z>
 22. *Jiang M., Liu Y., Ren L. et al.* Light regulates ascorbic acid accumulation and ascorbic acid-related genes expression in the peel of eggplant // *South African J. Bot.* 2018. V. 114. P. 20–28.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.012>
 23. *Wang Y., Zhao H., Qin H. et al.* The synthesis of ascorbic acid in rice roots plays an important role in the salt tolerance of rice by scavenging ROS // *Intern. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 11. Article E3347.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113347>
 24. *Дьяченко Е.А., Середин Т.М., Филюшин М.А.* Сравнительная оценка вариабельности ядерного и хлоропластного генома лука-порей (*Allium porrum* L.) // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2019. Т. 23. № 7. С. 902–909.
<https://doi.org/10.18699/VJ19.565>
 25. *Филюшин М.А., Холда О.А., Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н.* AFLP маркирование генотипов сортов лука-порей (*Allium porrum*) // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 4. С. 560–565.

Identification and Variability of the GDP-L-Galactose Phosphorylase Gene *ApGGP1* in Leek Cultivars

O. K. Anisimova^a, A. V. Shchennikova^a, E. Z. Kochieva^a, and M. A. Filyushin^{a, *}

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

The *ApGGP1* coding sequences, encoding GDP-L-galactose phosphorylase, the key enzyme of the L-galactose pathway of vitamin C biosynthesis, have been identified and characterized in a wide range of leek (*Allium porrum* L.) cultivars, differing in vitamin C content. Analysis of *ApGGP1* polymorphism in 35 leeks cultivars revealed 29 allelic variants, corresponding to 11 variants of the ApGGP1 protein. It was found that leek and other *Allium* species ApGGP1 sequences contain specific C-terminal motif (50 aa). The *ApGGP1* expression pattern was determined in various leek organs and tissues (roots, white shaft bottoms, light-green shafts, and green leaves (young and mature)). *ApGGP1* transcripts were detected in all analyzed tissues. The maximum expression level was observed in leaves, and the minimum – in white shaft bottoms. The level of gene expression in roots (non-photosynthetic tissue) was quite high and comparable with that in young green leaves.

Keywords: leek, *Allium porrum*, GDP-L-galactose phosphorylase, gene polymorphism, expression pattern.