

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ *GMP* У ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ ТОМАТА СЕКЦИИ *LYCOPERSICON*

Тяпкина Дарья Юрьевна^{1,2}, Кочиева Елена Зауровна²

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

²Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский институт селекции овощных культур», Москва, Россия

e-mail: daria_t@list.ru

Аннотация. Одомашнивание привело к снижению уровней содержания аскорбата в плодах культурного томата. В этой работе мы впервые секвенировали и охарактеризовали 11 генов-гомологов *GMP* из дикорастущих видов томата, играющих центральную роль в метаболическом пути биосинтеза аскорбата у растений.

Ключевые слова: *GMP*, томат, *S. lycopersicum*, аскорбат.

ГДФ-маннозопирофосфорилаза (*GMP*, *VTC1*) является одним из ключевых ферментов L-галактозного пути Смирнофф-Уэлера, который считается основным метаболическим путём накопления аскорбата в плодах и необходим для обратимого превращения D-маннозо-1-фосфата в GDP-D-маннозу [4, 2]. Ранее было показано, что у трансгенных растений с оверэкспрессией гена *GMP* содержание аскорбата повышалось на 70% в листьях, на 50% в зелёных плодах и на 35% в спелых плодах [1], в то время как у мутантных по данному гену растений было значительно снижено. К примеру, у арабидопсиса, мутантного по гену *vtc1* содержание аскорбата наблюдалось на 75% ниже, чем у растения дикого типа. При этом возвратная мутация приводила к восстановлению уровня аскорбата. Также оверэкспрессия *GMP* привела к увеличению концентрации аскорбата в 2,5 раза у табака, в 1,5 раза у риса и в 1,4–1,7 раза у томата [1, 5, 3]. В геноме томата *Solanum lycopersicum* L. обнаружено семейство генов *GMP*, состоящее из четырёх членов (*GMP1-GMP4*). Сайленсинг и оверэкспрессия гена *GMP3* томата приводили к уменьшению и увеличению уровня накопления аскорбата, соответственно. Именно поэтому ген *GMP* может считаться привлекательной мишенью для поиска генетических детерминант повышения уровня аскорбата в плодах томата. Однако до настоящего времени для видов секции *Lycopersicon* данный ген был аннотирован только у красноплодных видов томата *S. lycopersicum* сорт Heinz 1706 ([Chr3, NC_015440.3 60514258..60516592]), сорт A101 ([NM_001247096.2]), сорт Micro-Tom ([AK324992.1]) и зеленоплодного вида *S. pennellii* ([XM_015214839.2]). При этом известно, что образцы дикорастущих видов томата характеризуются высоким содержанием аскорбата в плодах,

превышающим более чем в 10 раз его содержание у сортов. Несмотря на то, что образцы дикорастущих видов могут быть донорами этого признака при селекции сортов с повышенным содержанием витамина С в плодах, основное генетическое разнообразие генов-гомологов *GMP*, которое сосредоточено в дикорастущих видах томата, до сих пор не было изучено.

В данной работе впервые была проведена амплификация, клонирование, секвенирование и биоинформатический анализ генов-гомологов *GMP* у образцов 11 видов дикорастущего (*S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum*, *S. neorickii*, *S. arcanum*, *S. habrochaites*) и культурного (*S. lycopersicum*) томата. Было показано, что структура данного гена у видов томата является достаточно консервативной. Все полученные последовательности имели характерную для гена GDP-маннозапирофосфорилазы структуру и содержали четыре экзона. Протяженность полученных полноразмерных последовательностей составила от 1603 п.н. (у *S. chilense*) до 1619 п.н. (у *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*, *S. habrochaites*). Длина данного гена у сорта *Silvestre recordo* томата овощного составила 1619 п.н. и была равна известной ранее последовательности *GMP S. lycopersicum* сорт Heinz 1706. Различия в длинах генов-гомологов *GMP* исследуемых образцов томата обусловлены наличием мелких инсерций и делеций в интронных последовательностях. Длины всех кодирующих последовательностей одинаковы и составляют 1086 п.н. Всего в анализируемых последовательностях *GMP* выявлено 75 однонуклеотидных замен (SNP); общий уровень варибельности составил 4.6% (относительно референсной последовательности гена *GMP S. lycopersicum* сорт Heinz 1706 [NM_001247914.2]). Большая часть однонуклеотидных замен (49 SNPs) локализовалась в интронах, в то время как в экзонах число полиморфных сайтов было почти в 2 раза меньше – 26 SNPs. Как и ожидалось, наибольший полиморфизм был обнаружен у эволюционно более древних зеленоплодных видов томата: из 75 SNPs, 63 замены были выявлены в последовательностях *GMP* зеленоплодных видов (*S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum*, *S. neorickii*, *S. arcanum*, *S. habrochaites*) томатов, в то время как в последовательностях красноплодных видов (*S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*) обнаружено всего 12 SNPs. Также в интронах зеленоплодных дикорастущих видов (*S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. neorickii*, *S. arcanum*, *S. pennellii* и *S. habrochaites*) было обнаружено 10 инделей, 7 из которых локализовались в интроне III. Половина из них была обнаружена в гомологе *S. pennellii* и одна в гомологе красноплодного томата *S. pimpinellifolium* (LA0480).

Анализ варибельности *GMP* у видов показал, что в ходе эволюции ген подвергался жесткому давлению стабилизирующего (негативного) отбора ($Ka/Ks = 0.12$).

Полученные нуклеотидные последовательности генов-гомологов *GMP* видов томата были транслированы и проанализированы. Длина всех аминокислотных последовательностей *GMP* видов томатов составила 361 а.о., что соответствует белку молекулярной массой около 39 кДа. В белковых последовательностях *GMP* выявлены три несинонимичные аминокислотные

замены: A93T обнаружена у дикорастущего красноплодного вида *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*, в то время как D99N и G102A обнаружены у дикорастущих зеленоплодных видов *S. galapagense* и *S. neorickii* соответственно. Было показано, что все замены расположены в одном мотиве протяжённостью 76-125 а. о., входящем в NTP-трансферазный домен (2-229 а. о).

Анализ аминокислотных последовательностей гена *GMP* у видов томата и других растительных гомологов в программе MEME 5.3.2 выявил 10 консервативных мотивов длиной 5 – 50 а.о., расположенных по всей длине белка. Сравнительный анализ показал, что количество и расположение мотивов было инвариантно у всех видов томата, а также одинаковым с другими представителями рода *Solanum* и арабидопсисом.

Алгоритм программы PROVEAN предсказал, что критической для функциональной активности белка может являться аминокислотная замена A93T. Интересно отметить, что красноплодный дикорастущий вид *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum* (VIR1018), в белковой последовательности которого обнаружена критическая замена A93T, по результатам проведённого нами биохимического HPLC анализа показывал высокое содержание аскорбата (150 мкг/мл) в зрелых плодах. Аналогичные данные по возможной значимости этой аминокислоты на содержание аскорбата были показаны и ранее.

Таким образом, проведенный анализ варибельности новых генов-гомологов *GMP* культивируемых и дикорастущих видов томата выявил достаточно высокий консерватизм как нуклеотидных, так и белковых последовательностей, что позволяет сделать вывод о том, что продукт данного гена играет важную роль в метаболизме растений и находится под жёстким давлением естественного отбора в ходе эволюции. Выявленная нуклеотидная замена G277A, приводящая к аминокислотной замене A93T может обладать селекционным потенциалом, как основа для создания молекулярного маркера, используемого при интрогрессии гомолога гена *GMP* из *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum* в геном томата овощного *S. lycopersicum*.

Библиографический список

1. Cronje C. Manipulation of L-ascorbic acid biosynthesis pathways in *Solanum lycopersicum*: Elevated GDP-mannose pyrophosphorylase activity enhances L-ascorbate levels in red fruit / C. Cronje, G.M. George, A.R. Fernie, J. Bekker, J. Kossmann, R. Bauer // *Planta*. – 2012. - 235. - 553–564.
2. Foyer C.H. Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives, and outstanding issues / C.H. Foyer, T. Kyndt, R.D. Hancock // *Antioxidants & redox signaling*. – 2020. - 32(7). - 463-85.
3. Li X. Biosynthetic gene pyramiding leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress tolerance in tomato / X. Li, J. Ye, S. Munir, T. Yang, W. Chen, G. Liu, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* - 2019. – 20 -1558. doi: 10.3390/ijms20071558
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals / N. Smirnoff // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – 122. - 116-129.

5. Zhang H. Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants / H. Zhang, et al. // Nat. Biotechnol. - 2018. – 36. - 894–898

VARIABILITY OF GMP GENES-HOMOLOGOUS IN WILD TOMATO SPECIES FROM THE LYCOPERSICON SECTION

Tyapkina D.Y. ^{1,2}, ***Kochieva E. Z.*** ²

1 L L C "Research Institute of Vegetable Breeding", Moscow, Russia

2 Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia

e-mail: daria_t@list.ru

Abstract. *Domestication led to a regression of ascorbate levels in cultivated tomato fruits. In this work, we for the first time sequenced and characterized 11 GMP homologous genes from wild tomato species that play a central role in the metabolic pathway of ascorbate biosynthesis in plants.*

Key words: *GMP, tomato, S. lycopersicum, ascorbate.*