





doi 10.18699/vjgb-25-23

Содержание витамина С и профиль экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля гибридов F₁ лука-порей (*Allium porrum* L.)

М.А. Филюшин , Т.М. Середин, А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева 

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

 michel7753@mail.ru

Аннотация. Лук-порей (*Allium porrum* L.) – экономически важная овощная культура семейства Amaryllidaceae с широким спектром лечебных и питательных качеств, в том числе благодаря накоплению витамина С (L-аскорбиновая кислота, аскорбат). Аскорбат – органическое водорастворимое соединение, которое выполняет множество функций в метаболизме клеток растения, в том числе участвует в качестве эффективного антиоксиданта в ответе растительных клеток на биотические и абиотические стрессовые факторы. Метаболизм аскорбата включает биосинтез (преимущественно L-галактозный путь) и рециклинг (восстановление окисленных форм до аскорбата). Генные сети, определяющие метаболизм аскорбата в растениях лука-порей, малоизучены. В настоящей работе гибриды F₁, полученные от 13 скрещиваний образцов лука-порей отечественной и зарубежной селекции, охарактеризованы по всхожести семян, содержанию аскорбата и экспрессии генов биосинтеза (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GaLDH* и *GaLDH*) и рециклинга (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) аскорбата в проростках, зеленых листьях и отбеленной части стебля взрослых растений. Также проведен поиск корреляций между уровнем экспрессии генов метаболизма аскорбата и количеством витамина С у лука-порей. Показано, что изучаемым гибридам присуща высокая (89–100 %) всхожесть семян, за исключением гибрида от скрещивания 74 × Аллигатор (55 %). В проростках и зеленых листьях образцов девяти гибридов F₁ выявлен повышенный уровень экспрессии генов *VTC2*, *MDHAR1*, *MDHAR4* и/или *MDHAR5*, что позволило считать эти образцы перспективными с точки зрения возможной стрессоустойчивости. Четыре гибрида, которые характеризовались наименьшим (33 × 30, 74 × Аллигатор) и наибольшим (81 × 95, 36 × 38) содержанием аскорбата в проростках, были выбраны для дальнейшего детального анализа взрослых растений на содержание растворимых сахаров и аскорбата, уровень экспрессии генов метаболизма аскорбата и морфологические характеристики (длина, толщина и масса ложного стебля). Выявлено, что зеленые листья гибридов 36 × 38 и 81 × 95 содержат существенно больше аскорбата, чем 33 × 30 и 74 × Аллигатор. В отбеленных стеблях всех четырех гибридов содержание аскорбата было значительно ниже, чем в зеленых листьях. Образцы 36 × 38 и 81 × 95 отличались также наибольшим количеством растворимых сахаров в отбеленной части ложного стебля, употребляемой в пищу. Гибрид 81 × 95 формировал ложный стебель, превышающий по размеру и массе стебель остальных трех гибридов. В зеленых листьях содержание аскорбата положительно коррелировало с уровнем экспрессии генов рециклинга аскорбата (*APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*), что может быть использовано в селекции стрессоустойчивых гибридов лука-порей с повышенным содержанием витамина С.

Ключевые слова: лук-порей; *Allium porrum* L.; витамин С; гены биосинтеза аскорбата; гены рециклинга аскорбата; растворимые сахара; экспрессия генов


Для цитирования: Филюшин М.А., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Содержание витамина С и профиль экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля гибридов F₁ лука-порей (*Allium porrum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):200-209. doi 10.18699/vjgb-25-23

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Vitamin C content and profile of ascorbate metabolism gene expression in green leaves and bleached parts of the pseudostem of leek (*Allium porrum* L.) F₁ hybrids

М.А. Filyushin , Т.М. Seredin, A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva 

Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 michel7753@mail.ru

Abstract. Leek (*Allium porrum* L.) is an economically important vegetable crop of the family Amaryllidaceae with a wide range of medicinal and nutritional properties, in part due to the accumulation of vitamin C (L-ascorbic acid, ascorbate). Ascorbate is an organic water-soluble compound, which performs many functions in plant cell metabolism, including as one of an effective antioxidant in plant cell responses to biotic and abiotic stress factors. Ascorbate metabolism includes biosynthesis (mainly the L-galactose pathway) and recycling (reduction of oxidized forms to ascorbate). The gene networks that determine ascorbate metabolism in leek plants are poorly understood. In this work, crosses of leek varieties/lines were carried out. Accessions of F₁ hybrids were characterized for seed germination rate, ascorbate content and expression of ascorbate biosynthesis (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GalDH*, *GalLDH*) and recycling (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) genes in seedlings, as well as green leaves and bleached stem parts of the adult plant. A search for correlations between the level of expression of ascorbate metabolism genes and the amount of vitamin C in leeks was also carried out. It was shown that the studied hybrids are characterized by high (89–100 %) seed germination, with the exception of the hybrid from the 74 × Alligator cross (55 %). An increased level of expression of the *VTC2*, *MDHAR1*, *MDHAR4* and/or *MDHAR5* genes was detected in the seedlings and green leaves of nine F₁ hybrids, which allowed us to consider these samples promising in terms of possible stress resistance. Four hybrids that were characterized by the lowest (33 × 30, 74 × Alligator) and highest (81 × 95, 36 × 38) ascorbate content in seedlings were selected for a further detailed analysis of adult plants for the content of soluble sugars and ascorbate, gene expression and morphological characteristics (length, thickness and weight of the false stem). It was confirmed that green leaves of the 36 × 38 and 81 × 95 hybrids contain significantly more ascorbate than the 33 × 30 and 74 × Alligator hybrids. In all four hybrids, the ascorbate content was significantly lower in the bleached stems than in the green leaves. Accessions 36 × 38 and 81 × 95 were also characterized by the highest amount of soluble sugars in the bleached part of the false stem used for food. In addition, the false stem formed by the 81 × 95 hybrid was larger and heavier than the stems of the other three hybrids. A direct dependence of ascorbate content on the transcript level of ascorbate recycling genes (*APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*) in green leaves was revealed, which can be used in the breeding of stress-resistant leek hybrids with a high content of vitamin C.

Key words: leek; *Allium porrum* L.; vitamin C; ascorbate biosynthesis genes; ascorbate recycling genes; soluble sugars; gene expression

For citation: Filyushin M.A., Seredin T.M., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Vitamin C content and profile of ascorbate metabolism gene expression in green leaves and bleached parts of the pseudostem of leek (*Allium porrum* L.) F₁ hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):200–209. doi 10.18699/vjgb-25-23

Введение

Виды лука, включая лук-порея (*Allium porrum* L.), обладают широким спектром питательных и лечебных свойств. Лук-порея, также известный как *A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) Gay, считается экономически важной овощной культурой, ценимой не только за пищевые качества, но и за антибактериальные, противораковые, кардиопротекторные и антиоксидантные свойства (Celebi-Toprak, Alan, 2021).

Селекция лука-порея направлена на увеличение длины, толщины, плотности и массы отбеленного стебля, употребляемого в пищу, улучшение его вкусовых и диетических качеств, а также на повышение всхожести семян и устойчивости к стрессовым факторам и стрелкованию (Swamy, Gowda, 2006; Celebi-Toprak, Alan, 2021). Нежный и сладкий вкус луку-порею придают растворимые сахара (5.0–11.2 г/100 г сырой массы) и витамин С (L-аскорбиновая кислота, аскорбат, АК) (0.9–3.6 мг/г сухой массы); при хранении количество АК в отбеленной части ложного стебля повышается более чем в 1.5 раза (Lundegårdh et al., 2008; Grzelak-Błaszczuk et al., 2011; Bernaert et al., 2012; Bernaert, 2013). Оба типа метаболитов играют значимую роль в защитных реакциях растения на стрессовые факторы (Yamada, Osakabe, 2018; Broad et al., 2020; Qi et al., 2020), а витамин С – также в оздоровлении человека (Nemilä, 2017).

Присутствие аскорбата положительно связано и с послеуборочной сохранностью отбеленного стебля, так как, в отличие от репчатого лука, срезаемый стебель лука-порея не находится в состоянии физиологического покоя и

быстро портится (Bernaert, 2013). Кроме того, сигнальные пути, зависящие от количества аскорбата и растворимых сахаров, во многом определяют онтогенез растения (Considine, Foyer, 2014; Yoon et al., 2021) и, следовательно, могут положительно влиять на размеры ложного стебля лука-порея.

Сравнение масляных экстрактов лука-порея и другой не менее популярной луковой культуры – чеснока (*A. sativum* L.) показало превосходство лука-порея по антиоксидантной активности во многом благодаря большим накоплениям витамина С (Lemma et al., 2022). Согласно немногим исследованиям, количество витамина С в зеленых листьях лука-порея может колебаться в пределах 2.8–8.5 и 0.9–3.6 мг/г сухой массы зеленых листьев и в употребляемой в пищу отбеленной части стебля (ложный стебель) соответственно (Lundegårdh et al., 2008; Bernaert et al., 2012).

Витамин С – органическое водорастворимое соединение, которое не синтезируется человеком, но является необходимой частью его рациона и поступает с растительной пищей, где количество аскорбата зависит от вида/сорта, ткани/органа и условий выращивания/хранения растений (Bulley, Laing, 2016). Помимо пользы для человека, в самом растении аскорбат участвует во многих аспектах развития, включая регуляцию клеточного метаболизма, а также представляет собой эффективный антиоксидант, поскольку накапливается в клетке в достаточном количестве и осуществляет тонкую регуляцию присутствия различных свободных радикалов, вступая с ними в реакцию (Arrigoni, De Tullio, 2002).

Значимость аскорбата для растения подчеркивается тем, что его синтез происходит по нескольким уникальным путям, среди которых доминирующим считается L-галактозный путь Смирнова–Уилера, проходящий восемь этапов преобразования исходного субстрата (D-фруктоза-6-Ф) в L-аскорбиновую кислоту (Bulley, Laing, 2016). Цепь биосинтеза включает реакции, катализируемые последовательно глюкозо-6-фосфатизомеразой (PGI), маннозо-6-фосфатизомеразой (PMI), фосфоманномутазой (PMM), GDP-маннозопирофосфорилазой (VTC1), GDP-манноза-3',5'-эпимеразой (GME), GDP-L-галактозофосфорилазой (VTC2, VTC5), L-галактозо-1-фосфатфосфатазой (GPP), L-галактозодегидрогеназой (GalDH) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой (GalLDH) (Bulley, Laing, 2016).

Рециклинг аскорбата происходит следующим образом. При взаимодействии аскорбата с активными формами кислорода, а также под действием аскорбатпероксидаз (APX) и аскорбатоксидаз (АО) аскорбат окисляется и переходит в монодегидроаскорбиновую кислоту (MDHA), которая может распадаться на дегидроаскорбиновую кислоту (DHA) и аскорбат (Bulley, Laing, 2016). Обе окисленные формы, MDHA и DHA, могут восстанавливаться до аскорбата с помощью монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR) соответственно (Bulley, Laing, 2016). Таким образом, концентрация аскорбата в растительной ткани определяется балансом между синтезом витамина С, его рециклингом и катаболизмом окисленных форм.

Генные сети метаболизма аскорбата изучаются на различных видах растений, включая культурные виды. К примеру, показано, что уровень экспрессии гена *VTC2* положительно связан с количеством аскорбата в ткани растения и с устойчивостью растений к абиотическим стрессовым факторам, и данный факт используется в селекции, направленной на увеличение содержания витамина С (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020). У модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. обнаружен паралог *VTC2* – ген *VTC5*, однако главная роль в определении скорости L-галактозного пути принадлежит именно *VTC2* (Dowdle et al., 2007).

Гены рециклинга аскорбата изучаются больше в аспекте их роли в определении стрессоустойчивости растений. В ответ на различные стрессовые факторы, как абиотические, так и биотические, изменяются уровень экспрессии генов семейства *MDHAR* и активность кодируемых ими ферментов (Letierrier et al., 2005; Dowdle et al., 2007; Gill, Tuteja, 2010; Feng et al., 2014; Lanubile et al., 2015; Zhang et al., 2015; García et al., 2020). Сверхэкспрессия генов *MDHAR* положительно влияет на устойчивость к солевому стрессу (Sultana et al., 2012; Qi et al., 2020). Однако в спелых плодах томата это значительно снижает содержание аскорбата (Haroldsen et al., 2011).

Генные сети, определяющие метаболизм аскорбата в растениях лука-порей (*A. porrum*), малоизучены. Охарактеризованы полиморфизм и профиль экспрессии гена *VTC2*, включая в ответ на холодостресс, а также показана корреляция уровня экспрессии *VTC2* с содержанием аскорбата в зеленых листьях (положительная) и белой части (отрицательная) (Анисимова и др., 2021а, б).

Идентифицированы и изучены три гена *MDHAR*, и выявлена положительная корреляция уровня мРНК *MDHAR4* с содержанием АК в белой части и зеленых листьях растения (Филушин и др., 2021). Других публикаций по анализу генов метаболизма АК у лука-порей не найдено.

Целью настоящей работы стали получение и сравнительная характеристика гибридов F₁ лука-порей от 13 скрещиваний образцов лука-порей отечественной и зарубежной селекции по содержанию витамина С и экспрессии генов биосинтеза (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GalDH* и *GalLDH*) и рециклинга (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) аскорбата в проростках, зеленых листьях и отбеленной части стебля взрослых растений. Проведена оценка корреляций между уровнем экспрессии анализируемых генов и количеством витамина С в тканях лука-порей.

Материалы и методы

Для исследования использовали семена гибридов F₁ от 13 скрещиваний (2022 г.) сортов/линий лука-порей отечественной и зарубежной селекции (табл. 1). Семена F₁ высевали (50 шт. от каждого скрещивания) в грунт (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16 ч/8 ч, 23 °C/21 °C), оценивали всхожесть и полученное потомство задействовали в анализе.

Надземную часть проростков (30 суток после всходов) гибридов F₁, а также зеленые листья и отбеленный ложный стебель взрослых растений на товарной стадии развития использовали в дальнейшем анализе.

Под товарной стадией развития подразумеваются растения до фазы цветения, рост которых завершен, а длина и диаметр стебля достигли финальных размеров. Образцы растительной ткани растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте и использовали для определения содержания (мг/100 г сырой массы) витамина С, сахарозы, глюкозы и фруктозы с помощью наборов Enzytec L-Ascorbic Acid, Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия), следуя протоколам, предоставленным производителем. Каждый из типов образца (проросток, зеленый лист или ложный стебель) растирали целиком и хранили при –80 °C, отбирая необходимую навеску для дальнейших анализов (определение концентрации аскорбата и экспрессии генов).

Экспрессию генов L-галактозного пути биосинтеза и пути рециклинга аскорбата определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Суммарную РНК выделяли из 0.2–0.5 г измельченной ткани с использованием RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Примеси ДНК удаляли с помощью RNase-free DNase set (QIAGEN) и кДНК синтезировали в системе GoScript Reverse Transcription System (Promega, США). Концентрацию кДНК определяли с применением Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США), Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) и 3 нг препарата использовали в реакцию ПЦР-РВ. Ген-специфичные праймеры для ПЦР-РВ были разработаны на основе доступных в NCBI геномных/транскриптомных данных *A. porrum* (PRJNA310797) и *A. sativum* (PRJNA606385, PRJNA607255) (табл. 2).

Таблица 1. Список скрещиваний образцов лука-порей

Название скрещивания	Родительская пара	Всхожесть семян F ₁ , %
28 × 30	Голиаф × Веста	100
85 × 99	Килима × Gaуia	98
94 × 113	Электро × Казачок	99
62 × 80	к-2197 × Американский флаг	95
85 × 86	Килима × Balder	100
12 × 13	Herbstreusen × Amarello	100
81 × 95	Winterreusen × Siegfried	100
36 × 38	Слон × Элефант	100
68 × 43	к-2120 × к-2054	89
74 × Аллигатор	к-2042 × Аллигатор	55
38 × 121	Элефант × Матейко	100
68 × 44	к-2120 × к-2026	96
33 × 30	Летний бриз × Веста	100

Таблица 2. Последовательности используемых в работе праймеров для ПЦР-ПВ

Ген	Последовательности (5'→3') праймеров (прямой/обратный)
<i>PGI</i>	CCATCGGAATTGGTGGTTCTG/ GTGCAATTTGGTGGTCGATTCC
<i>PMI</i>	CTGCTATTTCCGGCCCTTCTA/ ACATTCATCACCGTGAGCAG
<i>PMM</i>	TTCCTCGAGGTTGGGACAAGA/ TGTATGGCCGACAGTACGCT
<i>VTC1b</i>	TCGCTAACAAAGCCAATGATCCTG/ GCTCTGTCTCCTGAGAACATG
<i>GME1</i>	ACACGATGATTAGTTTCAACATG/ CTTGAGGCTCAGCAGGCCA
<i>GME2</i>	CAGGATTAATGGGGTCAAAGAC/ CTTGAGGCTCAGCAGGCCA
<i>VTC2</i>	GGTGTAAGCGTGTGTATCTG/ TTCCAAACAGCGGGATTGAC
<i>GPP</i>	GGTCACAGAAACTGATAAAGCATG/ CATCAGTAAGTAGAGCAGTGCC
<i>GaLDH</i>	CTACCACACTTGGTGGACAC/ CCTCTGTCCGCAAGGCCTTT
<i>GaLLDH</i>	TGGACTGCTAGGAGCAAGAGT/ GCCTTGCGTTAGCGTCA
<i>APX1</i>	GATTTATTGCGGAGAAGAAGTGC/ CAACTCAGCCTTGTGCCTCA
<i>APX2</i>	GAAGGAAATTGAGCGGGCTC/ GAGCCATTTGGGCCACCTG
<i>MDHAR1</i>	CTGGCAGTAAGCGTTCTCCA/ TTTGAACCTTGGCGAGCTTG
<i>MDHAR4</i>	CGCAGGTTATGCAGCTTCTG/ CGCCTACGCAAGTATGAAATGC
<i>MDHAR5</i>	GGGGCTCGCATAGATAAGTTGA/ TCCCACGGACTTATTCAGCC
<i>DHAR2</i>	AGTTCTGCAAGCAAAGCCTGC/ TCCCAGGCCATCTTTGGTTAC
<i>GR</i>	CGGCAAAAGAAAGTTCTCAGAGG/ AGGAGACTGCTCAGTGTGGAA

В реакции задействовали набор «2.5× реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ в присутствии SYBR Green I и ROX» (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-ПВ проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) по программе: 5 мин при 95 °С, 40 циклов (15 с при 95 °С; 40 с при 60 °С). Для нормализации экспрессии генов использовали два референса: гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и *Ubiquitin (UBQ)* (Анисимова и др., 2021а). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах. Обработку результатов и корреляционный анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism v. 9.5.1 (GraphPad Software Inc., США) (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Морфологическую характеристику (длина, толщина и масса отбеленной части (ложный стебель)) растений лука-порей проводили в сентябре 2023 г., используя по 10 образцов каждого анализируемого гибрида. Растения были выращены в коллекционном луковом питомнике (координаты теплицы 55.655182, 37.206576 (Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, канд. с.-х. наук Т.М. Середин).

Результаты

В настоящей работе охарактеризовано 13 гибридов F₁, полученных от скрещиваний отечественных и зарубежных сортов/линий лука-порей (см. табл. 1).

В проростках F₁ были определены содержание аскорбата, а также уровень экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата и пути его рециклинга (рис. 1 и 2).

Наибольшее количество витамина С обнаружено в проростках от скрещиваний 36 × 38 и 81 × 95, наименьшее – от скрещиваний 33 × 30 и 74 × Аллигатор, тогда как остальные образцы показывали промежуточные значения (5–7.5 мг/100 г сырой массы) (см. рис. 1).

На тепловой карте экспрессии генов синтеза аскорбата образцы 36 × 38 и 81 × 95 заняли соседние позиции в кластере, в котором также присутствовали и образцы со средним (85 × 86, 38 × 121) и наименьшим (74 × Аллигатор)

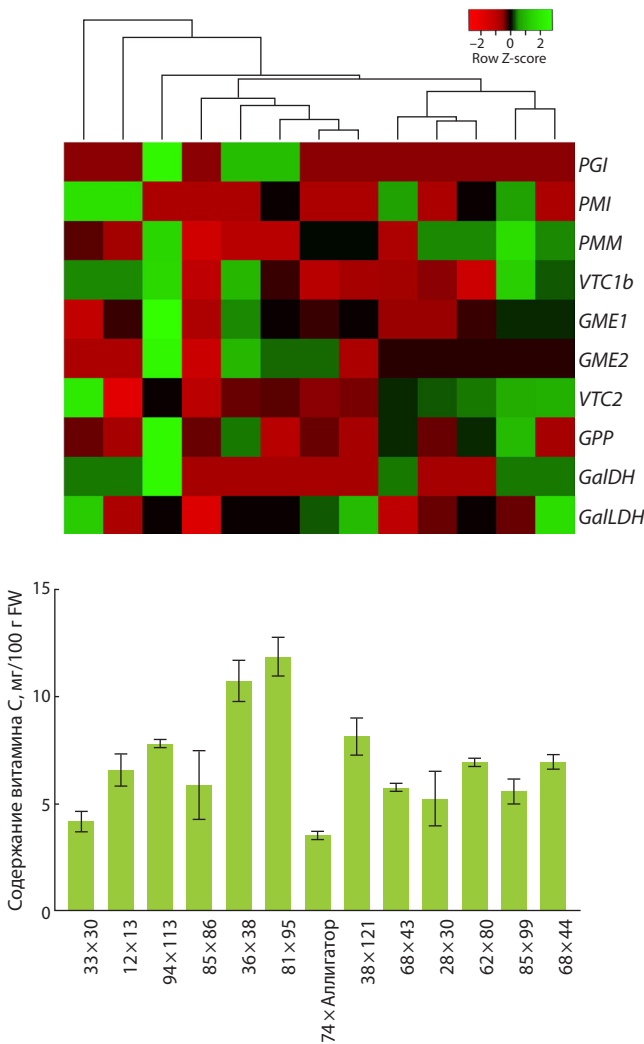


Рис. 1. Тепловая карта экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата (*PGI*, *PMI*, *PMM*, *VTC1b*, *GME1*, *GME2*, *VTC2*, *GPP*, *GalDH* и *GalLDH*) и содержание витамина С (мг/100 г сырой массы) в проростках гибридов F₁ от 13 скрещиваний сортов/линий лука-порей.

содержанием аскорбата. Пять образцов (68 × 43, 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44), характеризовавшихся сходным средним содержанием аскорбата, сформировали отдельный кластер (см. рис. 1).

На тепловой карте экспрессии генов рециклинга аскорбата пары гибридов с наибольшим (36 × 38, 81 × 95) и наименьшим (33 × 30, 74 × Аллигатор) содержанием витамина С сформировали два отдельных обособленных кластера. Отметим также два кластера, 94 × 113/68 × 44 и 85 × 99/85 × 86, образцы в которых были высоко сходны по генной экспрессии и содержанию аскорбата (см. рис. 2).

Для дальнейшего анализа были выбраны гибриды, контрастные по количеству витамина С в проростках, 36 × 38 и 81 × 95 (наибольшее), 33 × 30 и 74 × Аллигатор (наименьшее). В сентябре 2023 г. по 10 взрослых растений F₁ от данных скрещиваний были охарактеризованы по содержанию аскорбата и уровню экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата и генов рециклинга аскорбата в зеленых листьях и отбеленном ложном стебле.

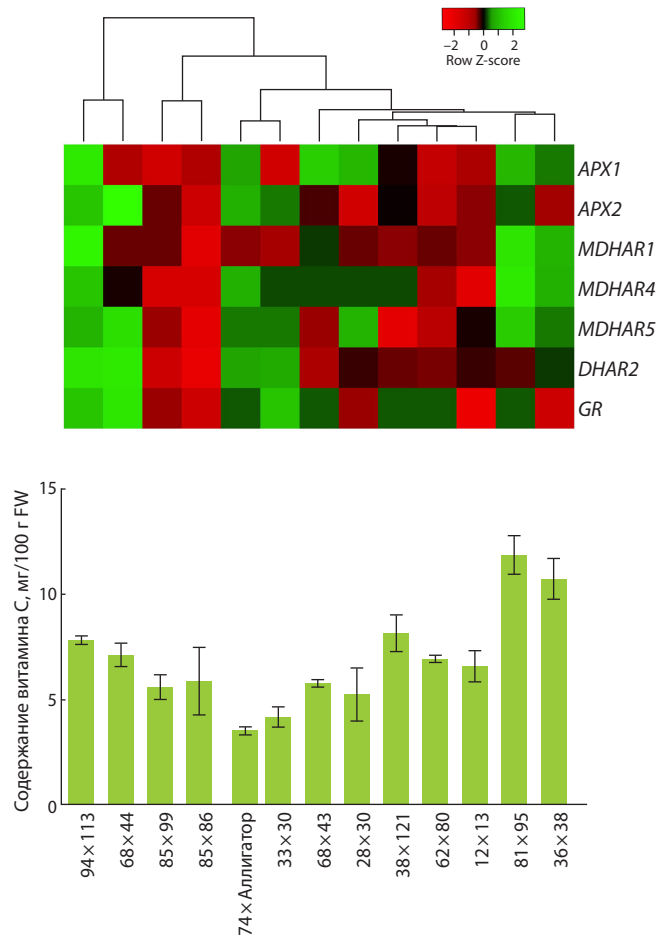


Рис. 2. Тепловая карта экспрессии генов рециклинга аскорбата (*APX1*, *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*, *DHAR2*, *GR*) и содержание витамина С (мг/100 г сырой массы) в проростках гибридов F₁ от 13 скрещиваний сортов/линий лука-порей.

Обнаружено, что зеленые листья растений 36 × 38 и 81 × 95 содержат сходное (~35 мг/100 г сырой массы) количество аскорбата, что ожидаемо оказалось существенно больше такового у растений 33 × 30 и 74 × Аллигатор (~25 и ~17 мг/100 г сырой массы соответственно). В отбеленных ложных стеблях растений всех четырех типов содержание аскорбата было значительно ниже, чем в зеленых листьях, и не превышало 6.5 мг/100 г сырой массы. При этом растения 33 × 30 и 74 × Аллигатор имели сходные средние значения, а оставшиеся два образца характеризовались наименьшим (81 × 95) и наибольшим (36 × 38) количеством витамина С (рис. 3).

Анализ генной экспрессии показал, что у всех четырех образцов уровень экспрессии генов биосинтеза аскорбата в отбеленной части ложного стебля преимущественно выше, чем в зеленых листьях, за исключением генов *PMI*, *PMM*, *VTC2* и *GalLDH* (рис. 4). Какой-либо зависимости кластеризации образцов на тепловой карте экспрессии от содержания аскорбата (см. рис. 3) не наблюдалось (см. рис. 4).

Наибольшим уровнем мРНК генов рециклинга аскорбата отличались зеленые листья анализируемых растений, кроме генов *APX1*, *MDHAR5* и *DHAR2* с более высокой

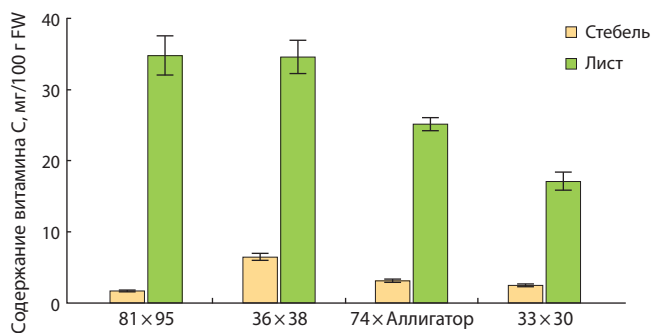


Рис. 3. Содержание аскорбата в отбеленном ложном стебле и листьях взрослых растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

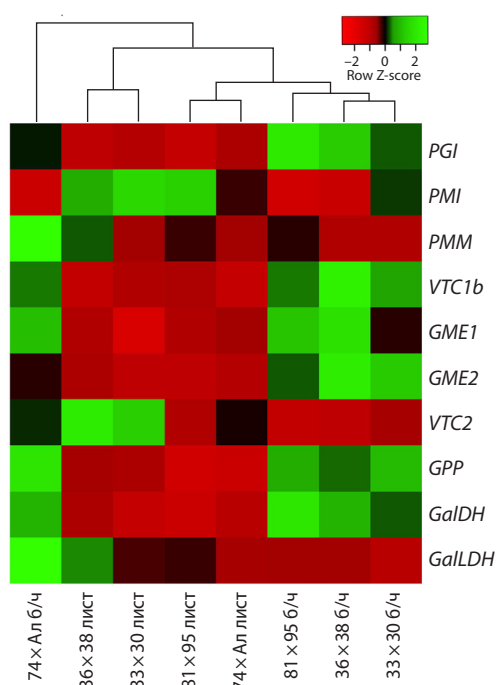


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии генов L-галактозного пути биосинтеза аскорбата в белой части (б/ч) и листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

экспрессией в ложном стебле (рис. 5). При этом на тепловой карте наблюдалось четкое формирование двух кластеров, объединяющих ложные стебли и зеленые листья соответственно (см. рис. 5). В «листовом» кластере обособлены образцы с повышенным содержанием витамина С в листьях (36 × 38 и 81 × 95), и при кластеризации только по уровню экспрессии генов в листьях образцы строго разделяются на группы с высоким (36 × 38 и 81 × 95) и низким (74 × Аллигатор, 33 × 30) содержанием витамина С (рис. 6). При этом листья образцов 36 × 38 и 81 × 95 (в сравнении с образцами 74 × Аллигатор и 33 × 30) отличаются значительно более высокой экспрессией генов рециклинга аскорбата за редким исключением (*APX1* и *MDHAR5* у растений 81 × 95) (см. рис. 6).

В случае кластера «ложного стебля» зависимости группирования образцов от количества аскорбата не на-

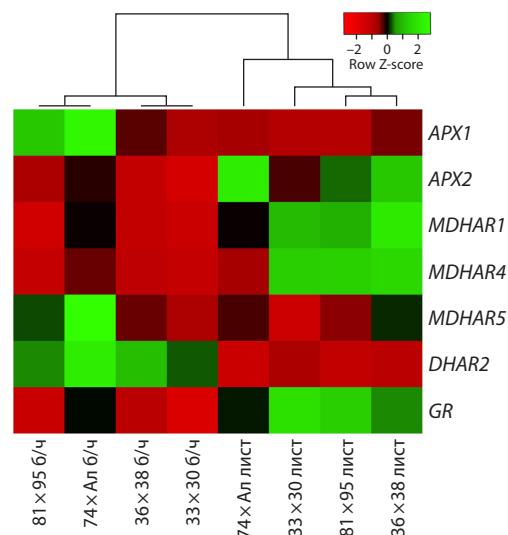


Рис. 5. Тепловая карта экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в белой части (б/ч) и листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

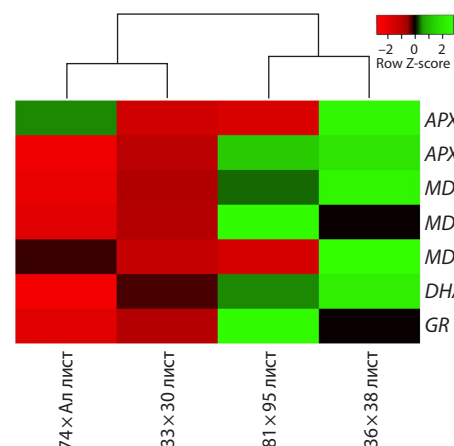


Рис. 6. Тепловая карта экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 74 × Аллигатор, 33 × 30, 81 × 95 и 36 × 38.

блюдалось. К примеру, растения 74 × Аллигатор и 33 × 30 отнесены в отдельные группы (см. рис. 5), несмотря на сходное содержание витамина С (см. рис. 3).

Далее с использованием данных по проросткам и взрослым растениям был проведен поиск возможных взаимосвязей между содержанием аскорбата и уровнем экспрессии генов, в результате чего была обнаружена высокая корреляция для генов рециклинга аскорбата *APX2*, *MDHAR1* и *MDHAR4* ($r = 0.94, 0.95$ и 0.74 соответственно) в листовой ткани (рис. 7).

Анализируемые четыре гибридные линии были охарактеризованы по морфологическим признакам. Показано, что гибрид 81 × 95 формирует мощный ложный стебель длиной 25–30 см, толщиной 3.5–5 см, массой 250–350 г, с плотным расположением листьев. Гибрид 36 × 38 имеет мощный ложный стебель длиной 20–25 см, толщиной

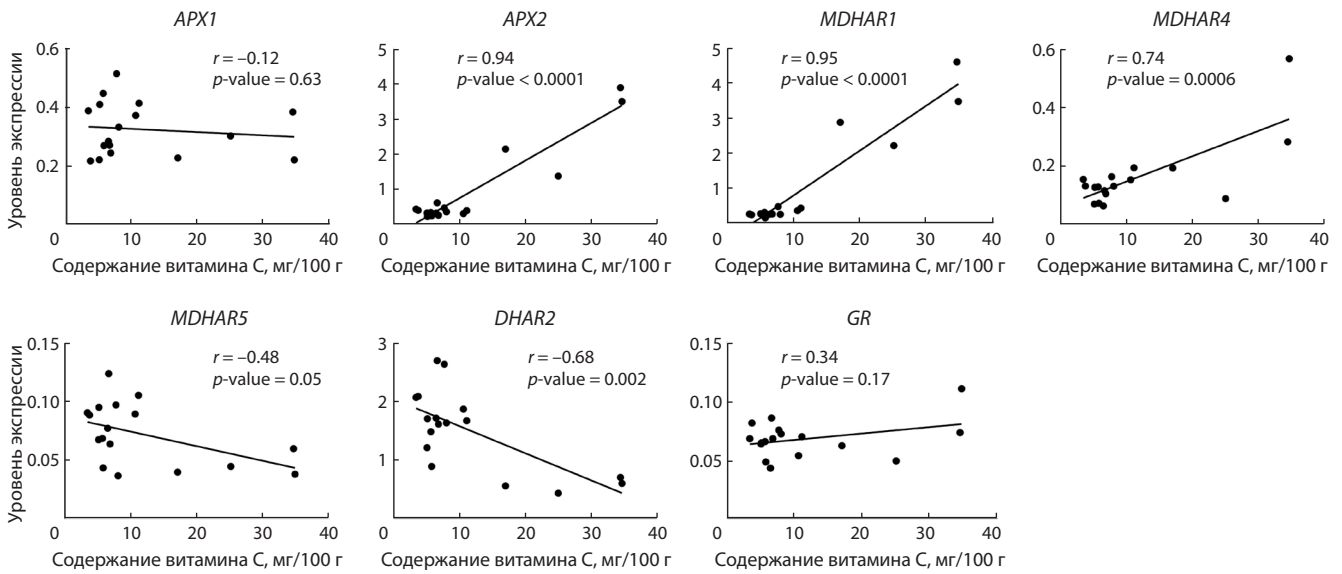


Рис. 7. Линейная регрессия содержания витамина С и уровней экспрессии генов пути рециклинга аскорбата в листовой ткани растений гибридов F₁ лука-порей.

r – коэффициент корреляции Пирсона (наличие корреляции при $p < 0.01$).



Рис. 8. Внешний вид товарной части растений гибридов F₁ от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

Масштабная линия 10 см.

3–4.5 см, массой 200–300 г, с плотным расположением листьев (рис. 8). Оба гибрида характеризуются 100 % всхожестью семян (см. табл. 1).

Ложный стебель гибрида 74 × Аллигатор длинный (20–25 см) и тонкий (1.5–2.5 см), массой 100–150 г; луковица выражена; растения значительно отстают в росте от остальных исследуемых гибридов. Гибриду 33 × 30 свойствен мощный неплотный ложный стебель длиной 20–25 см, толщиной 2.5–3.5 см и массой 150–250 г; лу-

ковица выражена (см. рис. 8). Гибриды отличаются 55 % (74 × Аллигатор) и 100 % (33 × 30) всхожестью семян (см. табл. 1).

Гибриды также были дополнительно изучены по содержанию растворимых сахаров в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля. Показано, что в сравнении с листьями ложный стебель обогащен сахарозой и содержит в ~1.5–3 раза меньше фруктозы (рис. 9). Количество глюкозы оказалось более вариabельным: сходным между

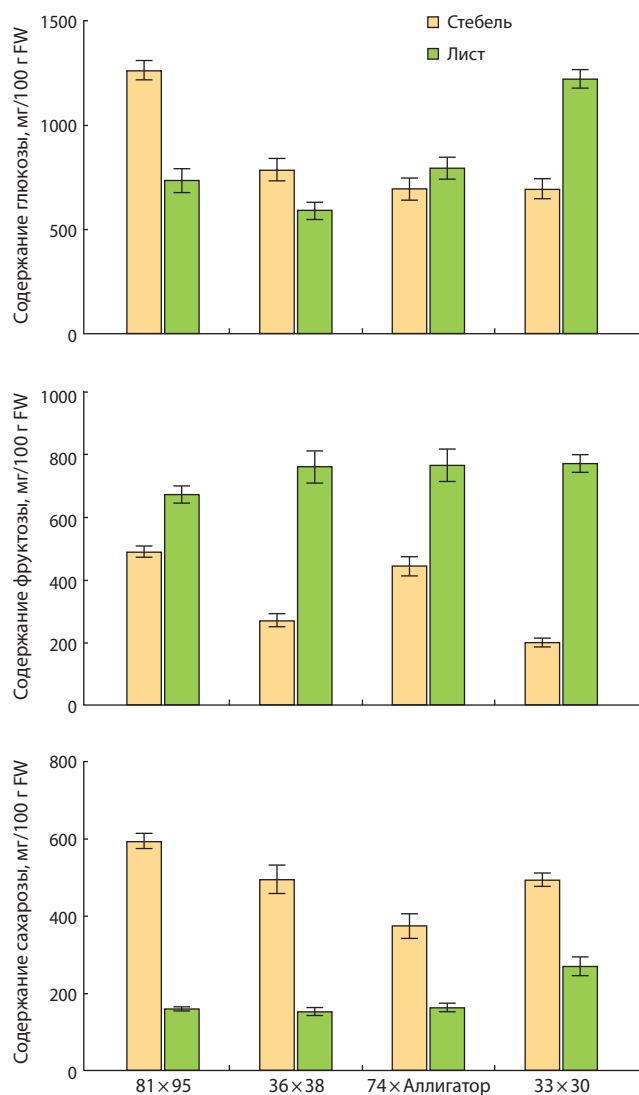


Рис. 9. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы в ложном стебле и листовой ткани взрослых растений гибридов F₁ лука-порей от скрещиваний 81 × 95, 36 × 38, 74 × Аллигатор и 33 × 30.

листьями и стеблем (36 × 38, 74 × Аллигатор), наибольшим в стебле (81 × 95), наибольшим в листьях (33 × 30) (см. рис. 9). Рассматривая употребляемую в пищу отбеленную часть стебля, можно сказать, что наибольшие количества всех трех сахаров содержатся у гибрида F₁ от скрещивания 81 × 95; наименьшее количество фруктозы – 33 × 30, сахарозы – 74 × Аллигатор; содержание глюкозы сходно у трех гибридов: 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор (см. рис. 9).

Обсуждение

В настоящей работе проведен анализ 13 гибридов F₁ лука-порей, имеющих всхожесть семян выше 50 % (см. табл. 1), по содержанию аскорбата и экспрессии генов биосинтеза и рециклинга аскорбата в проростках (см. рис. 1 и 2). Колебания количества витамина С в пределах 30 % между гибридами (см. рис. 1) согласовались с показанными ранее различиями в концентрации аскорбата и зеленых листьях и в ложном стебле лука-порей (Lundegårdh et al., 2008; Bernaert et al., 2012).

Отобранные образцы двух гибридов F₁, 81 × 95 и 36 × 38, перспективные в связи с наибольшим содержанием витамина С, были далее изучены на товарной стадии развития в сравнении с двумя гибридами F₁ (74 × Аллигатор, 33 × 30) с наименьшим количеством витамина С. Характеристика включала анализ концентрации аскорбата/растворимых сахаров и экспрессии генов метаболизма аскорбата в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля, а также морфологическое описание (см. рис. 3–9).

Было определено, что данные, полученные при анализе содержания аскорбата в проростках, можно применять для оценки признака только в случае зеленых листьев взрослых растений, тогда как отбеленная часть ложного стебля показывает вариабельные данные (см. рис. 3). Один из перспективных гибридов (36 × 38) продемонстрировал наибольшее накопление витамина С в ложном стебле, тогда как второй гибрид (81 × 95) – напротив, наименьшие среди четырех образцов количества аскорбата (см. рис. 3).

Сопоставление данных по содержанию аскорбата и кластеризации исследуемых образцов по профилю экспрессии генов синтеза витамина С (см. рис. 4) выявило, что профиль экспрессии всех генов пути нельзя использовать для заключений о количестве аскорбата в листьях или стебле лука-порей. В том числе не подходит для предсказания и уровень экспрессии гена *VTC2* (см. рис. 1 и 4), для которого ранее была предложена связь с накоплением аскорбата (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020), в том числе у лука-порей (Анисимова и др., 2021а).

Тем не менее установленный нами у гибридов уровень транскриптов гена *VTC2* может помочь с определением степени стрессоустойчивости образцов, поскольку уровень экспрессии *VTC2* положительно связывают с устойчивостью растений к абиотическим стрессовым факторам (Ali et al., 2019; Broad et al., 2020). На основе наших результатов (экспрессия в проростках или зеленых листьях (см. рис. 1 и 4)), можно выделить шесть перспективных гибридов, среди которых находятся и два из четырех выбранных в анализ (исследуемые 33 × 30 и 36 × 38, а также 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44).

Сопоставление биохимических данных и кластеризации гибридов по экспрессии генов рециклинга аскорбата (см. рис. 5 и 6) позволило предположить наличие зависимости уровня накопления аскорбата в листьях или стебле лука-порей от профиля экспрессии генов пути. Кроме того, так как повышенную активность генов *MDHAR* и кодируемых ими ферментов связывают со стрессоустойчивостью растений (Zhang et al., 2015; Qi et al., 2020), на основе наших данных по трем генам *MDHAR* (см. рис. 2, 5, 6) можно выделить семь перспективных гибридов, среди которых находятся и все четыре образца, выбранные в анализ (исследуемые 81 × 95, 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор, а также 94 × 113, 68 × 44, 28 × 30).

Проведенный нами поиск статистически достоверных зависимостей между содержанием аскорбата и уровнем экспрессии генов метаболизма аскорбата обнаружил корреляции только в зеленой ткани растений (проростки, зеленые листья) и лишь для трех генов рециклинга аскорбата, *APX2*, *MDHAR1* и *MDHAR4* (см. рис. 7). Это

подтверждает выявленную нами ранее положительную связь уровня мРНК *MDHAR4* с содержанием витамина С в растениях лука-порей (Филошин и др., 2021).

Характеристика исследуемых гибридов по содержанию растворимых сахаров в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля показала отсутствие какой-либо зависимости от концентрации аскорбата (см. рис. 9). Тем не менее, учитывая полученные данные, можно предполагать большую питательную ценность отбеленной части ложного стебля у гибрида F₁ 81 × 95, отличающегося и наибольшим количеством аскорбата.

Морфологическое описание анализируемых гибридов F₁ выявило, что наибольшие количества сахаров (см. рис. 9) соответствуют наибольшему размеру и массе ложного стебля у образца от скрещивания 81 × 95. Остальные три гибрида с учетом усредненных данных по всем трем типам сахаров в отбеленной части (суммарно 1500–1600 мг/100 г сырой массы (см. рис. 9)) соответствуют сходной длине ложного стебля (20–25 см vs 25–30 см у 81 × 95). Однако варианты других параметров стебля (толщина, масса) у данных трех гибридов никак не согласуются ни с суммой сахаров, ни с содержанием каждого отдельного вида сахара.

Заключение

Таким образом, характеристика гибридов F₁ лука-порей от 13 скрещиваний позволила выделить девять образцов, перспективных с точки зрения стрессоустойчивости: 81 × 95, 36 × 38, 33 × 30, 74 × Аллигатор, 94 × 113, 28 × 30, 62 × 80, 85 × 99, 68 × 44. Из них восемь гибридов показали 95–100 % всхожесть семян (исключение: 74 × Аллигатор, 55 %). Два гибрида, 81 × 95, 36 × 38, отличались наибольшим содержанием аскорбата в зеленой ткани (проростки, зеленые листья) растения и один, 36 × 38, – в отбеленной части ложного стебля, употребляемой в пищу. Гибрид 81 × 95 также накапливал наибольшее количество растворимых сахаров в отбеленной части. Найденная прямая зависимость содержания аскорбата от активности генов рециклинга аскорбата (*APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4*) в зеленых листьях может быть использована в селекции стрессоустойчивых гибридов с повышенным содержанием витамина С. Необходимы дальнейшие исследования возможной связи уровня экспрессии генов *APX2*, *MDHAR1*, *MDHAR4* и *VTC2* с устойчивостью растения к различным неблагоприятным факторам, результаты которых можно будет использовать в селекции стрессоустойчивых гибридов лука-порей.

Список литературы / References

Анисимова О.К., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филошин М.А. Оценка содержания витамина С и экспрессии гена ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*VTC2*) у сортов лука-порей (*Allium porrum* L.). *Физиология растений*. 2021a;68(1):75–84. doi 10.31857/S0015330320060020
[Anisimova O.K., Seredin T.M., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Estimation of the vitamin C content and GDP-L-galactose phosphorylase gene (*VTC2*) expression level in leek (*Allium porrum* L.) cultivars. *Russ J Plant Physiol*. 2021a;68(1):85–93. doi 10.1134/S1021443720060023]
Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филошин М.А. Идентификация и полиморфизм гена ГДФ-Л-галактозофосфо-

риказы (*ApGGPI*) у сортов лука-порей. *Генетика*. 2021b;57(3):311–320. doi 10.31857/S0016675821030036
[Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Identification and variability of the GDP-L-galactose phosphophorylase gene *ApGGPI* in leek cultivars. *Russ J Genet*. 2021b;57(3):311–318. doi 10.1134/S1021443720060023]
Филошин М.А., Анисимова О.К., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Корреляция содержания аскорбиновой кислоты и профиля экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHARs) у лука-порей (*Allium porrum* L.). *Физиология растений*. 2021;68(5):501–508. doi 10.31857/S0015330321050031
[Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Correlation of ascorbic acid content and the pattern of monodehydroascorbate reductases (MDHARs) gene expression in leek (*Allium porrum* L.). *Russ J Plant Physiol*. 2021;68(5):849–856. doi 10.1134/S1021443721050034]
Ali B., Pantha S., Acharya R., Ueda Y., Wu L.-B., Ashrafuzzaman M., Ishizaki T., Wissuwa M., Bulley S., Frei M. Enhanced ascorbate level improves multi-stress tolerance in a widely grown indica rice variety without compromising its agronomic characteristics. *J Plant Physiol*. 2019;240:152998. doi 10.1016/j.jplph.2019.152998
Arrigoni O., De Tullio M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1569(1-3):1–9. doi 10.1016/S0304-4165(01)00235-5
Bernaert N. Bioactive compounds in leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*): analysis as a function of the genetic diversity, harvest time and processing techniques. Doctoral dissertation. Ghent: Ghent University, 2013
Bernaert N., De Paeppe D., Bouten C., De Clercq H., Stewart D., Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B. Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food Chem*. 2012;134:669–677. doi 10.1016/j.foodchem.2012.02.159
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. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1790. doi 10.3390/ijms21051790
Bulley S., Laing W. The regulation of ascorbate biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2016;33:15–22. doi 10.1016/j.pbi.2016.04.010
Celebi-Toprak F., Alan A.R. In vitro gynogenesis in leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Methods Mol Biol*. 2021;2287:171–184. doi 10.1007/978-1-0716-1315-3_7
Considine M.J., Foyer C.H. Redox regulation of plant development. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(9):1305–1326. doi 10.1089/ars.2013.5665
Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnov N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling. *Plant J*. 2007;52:673–689. doi 10.1111/j.1365-3113X.2007.03266.x
Feng H., Liu W., Zhang Q., Wang X., Wang X., Duan X., Li F., Huang L., Kang Z. *TaMDHAR4*, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Plant Physiol Biochem*. 2014;76:7–16. doi 10.1016/j.plaphy.2013.12.015
García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P., García M., Hernández J.A. The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress. *Antioxidants (Basel)*. 2020;12:67. doi 10.3390/antiox9010067
Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010;48:909–930. doi 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
Grzelak-Błaszczak K., Kołodziejczyk K., Badałek E., Adamicki F. Changes in the contents of mono-, di- and oligosaccharides in leek plants stored in cold room. *Eur Food Res Technol*. 2011;232(6):1027–1033. doi 10.1007/s00217-011-1476-y
Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S., Lorence A., Bennett A.B. Constitutively expressed *DHAR* and *MDHAR* influence fruit, but

- not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiol Biochem.* 2011; 49:1244-1249. doi 10.1016/j.plaphy.2011.08.003
- Hemilä H. Vitamin C and infections. *Nutrients.* 2017;9(4):339. doi 10.3390/nu9040339
- Lanubile A., Maschietto V., De Leonardi S., Battilani P., Paciolla C., Marocco A. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes. *Mol Plant Microbe Interact.* 2015;28(5):546-557. doi 10.1094/MPMI-09-14-0269-R
- Lemma E., Yusuf Z., Desta M., Seyida S., Idris M., Mengistu S., Teneshu J. Physicochemical properties and biological activities of garlic (*Allium sativum* L.) bulb and leek (*Allium ampeloprasum* L. var. *porrum*) leaf oil extracts. *Sci World J.* 2022;2022:6573754. doi 10.1155/2022/6573754
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2111-2123. doi 10.1104/pp.105.066225
- Lundegårdh B., Botek P., Schulzov V., Hajslov J., Strömberg A., Andersson H.C. Impact of different green manures on the content of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and L-ascorbic acid in leek (*Allium porrum*). *J Agric Food Chem.* 2008;56(6):2102-2111. doi 10.1021/jf071710s
- Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L., Kunzhi L., Huini X., Xudong S. Overexpression of *SIMDHAR* in transgenic tobacco increased salt stress tolerance involving S-nitrosylation regulation. *Plant Sci.* 2020;299:110609. doi 10.1016/j.plantsci.2020.110609
- Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M., Namasivayam P., Napis S., Ho C.L. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice. *J Plant Physiol.* 2012;169:311-318. doi 10.1016/j.jplph.2011.09.004
- Swamy K.R.M., Gowda R.V. Leek and shallot. In: Peter K.V. (Ed.) *Handbook of Herbs and Spices.* Vol. 3. 2006;365-389. doi 10.1533/9781845691717.3.365
- Yamada K., Osakabe Y. Sugar compartmentation as an environmental stress adaptation strategy in plants. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;83:106-114. doi 10.1016/j.semcdb.2017.12.015
- Yoon J., Cho L.H., Tun W., Jeon J.S., An G. Sucrose signaling in higher plants. *Plant Sci.* 2021;302:110703. doi 10.1016/j.plantsci.2020.110703
- Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules.* 2015;20:20939-20954. doi 10.3390/molecules201119741

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.07.2024. После доработки 08.10.2024. Принята к публикации 08.11.2024.