


doi 10.18699/vjgb-25-07

Циркадные колебания содержания растворимых сахаров и экспрессии генов инвертаз *TAI*, *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* в листьях растения томата (*Solanum lycopersicum* L.)

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

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
 michel7753@mail.ru

Аннотация. Содержание основных для плода томата (*Solanum lycopersicum* L.) гексоз (фруктозы, глюкозы) регулируется совместной активностью ферментов гидролиза сахарозы (включая инвертазы), ингибиторов инвертаз и транспортеров сахаров. Кроме вкусовых качеств, растворимые сахара тесно связаны со стрессоустойчивостью растений томата. В настоящей работе была определена суточная динамика содержания растворимых сахаров (сахарозы, фруктозы и глюкозы), а также экспрессия генов ферментов гидролиза сахарозы (вакуолярной инвертазы *TAI*, инвертазы клеточной стенки *LIN6*) и транспортера гексоз (*STP1*) в листьях растений томата сорта Корнеевский. Было показано, что количество сахаров и уровень транскриптов генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* зависят от циркадного ритма и соответствуют биологическим процессам, протекающим в растении в разное время суток. Содержание сахарозы и гексоз в течение суток изменяется сходным образом. В начале световой фазы концентрация сахаров минимальна, в конце – имеет наибольшие дневные значения; в начале темновой фазы демонстрирует остаточный рост и затем снижается к концу фазы. Анализ *in silico* органоспецифичной экспрессии *TAI*, *LIN6* и *STP1* у сорта Micro-Том *S. lycopersicum* показал наличие их транскриптов во всех тканях. Ген *TAI* экспрессировался наиболее активно в спелых плодах, тогда как уровень транскриптов *LIN6* и *STP1* в этих органах носил следовой характер. В листьях уровень мРНК *TAI* был выше, чем таковой *LIN6* и *STP1*, в ~2 и ~27 раз соответственно. Анализ с помощью ПЦР-РВ суточной динамики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в листьях растений сорта Корнеевский показал, что гены экспрессируются во всех проанализированных временных точках. Колебания уровня экспрессии генов происходят сходным образом: уровень мРНК достигает пиковых значений в середине световой и темновой фаз. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата и могут быть использованы в селекции при прогнозировании стрессоустойчивости растений.

Ключевые слова: томат; *Solanum lycopersicum* L.; растворимые сахара; инвертазы; транспортер гексоз; экспрессия генов; циркадный ритм.

Для цитирования: Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Циркадные колебания содержания растворимых сахаров и экспрессии генов инвертаз *TAI*, *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* в листьях растения томата (*Solanum lycopersicum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):55-60. doi 10.18699/vjgb-25-07

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФ (грант № 24-16-00043, биохимический и экспрессионный анализы) и Министерства образования и науки РФ (получение семенного материала и подготовка растений к анализу).

Diurnal fluctuations in the content of soluble sugars and the expression of the *TAI* and *LIN6* invertase genes and the *STP1* sugar transporter gene in the leaves of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

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

Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
 michel7753@mail.ru

Abstract. The content of hexoses (fructose, glucose) essential for the fruit of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is regulated by the joint activity of sucrose hydrolysis enzymes (including invertases), invertase inhibitors, and sugar transporters. In addition to fruit taste, soluble sugars are closely related to the stress resistance of the tomato plant. In this work, we determined the diurnal dynamics of the content of soluble sugars (sucrose, fructose and glucose) and the expression of genes for sucrose hydrolysis enzymes (vacuolar invertase *TAI*, cell wall invertase *LIN6*) and the hexose transporter (*STP1*) in the leaves of the tomato variety Korneevsky. It was shown that both the amount of sugars and the level of transcripts of the *TAI*, *LIN6* and *STP1* genes depend on the circadian rhythm and correspond to the biological processes occurring in the plant at

different periods of the day. The content of sucrose and hexoses changes in a similar way during the day. At the beginning of the light phase, the concentration of sugars is minimal, at the end it has the highest daily values; at the beginning of the dark phase, it shows a residual increase and then decreases towards the end of the phase. *In silico* analysis of organ-specific expression of *TAI*, *LIN6* and *STP1* in *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom showed the presence of mRNA of all three genes in all tissues. The *TAI* gene was expressed most strongly in ripe fruits, while the level of *LIN6* and *STP1* transcripts was extremely low. The level of *TAI* mRNA in the leaves was ~2 times higher than that of *LIN6* and ~27 times higher than that of *STP1*. Analysis using qRT-PCR of the diurnal dynamics of *TAI*, *LIN6* and *STP1* expression in the cv. Korneevsky leaves showed that all three genes were expressed at all points analyzed. Fluctuations in their expression levels occur in a similar manner: mRNA levels reach peak values in the middle of the light and dark phases. The results obtained are important for understanding the functions of invertases and sugar transporters in the tomato plant, and can be used in predicting the stress resistance of plants in tomato breeding.

Key words: tomato; *Solanum lycopersicum* L.; soluble sugars; invertases; hexose transporter; gene expression; circadian rhythm.

For citation: Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Diurnal fluctuations in the content of soluble sugars and the expression of the *TAI* and *LIN6* invertase genes and the *STP1* sugar transporter gene in the leaves of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):55-60. doi 10.18699/vjgb-25-07

Введение

Благодаря фотосинтезу растение накапливает ассимиляты – жизненно важные органические соединения, утилизируемые для дыхания, поддержания клеточного метаболизма, роста и развития. Основная транспортная форма фотоассимилятов у растений представлена сахарозой (Lemoine et al., 2013). Сигналом к распределению фотоассимилятов служат молекулы сахарозы и глюкозы, количество которых влияет на регуляцию активности генов онтогенеза, включая гены фотосинтеза и углеводного обмена (Koch, 2004; González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

После доставки в запасующие ткани (цветки, плоды, клубни и др.) сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу с помощью сахарозосинтаз (обратимый гидролиз) или инвертаз (необратимый гидролиз). Функции последних отличаются высокой вариабельностью и тесно связаны с локализацией в различных клеточных компартментах (Roitsch, González, 2004). Уровень экспрессии генов инвертаз зависит от типа ткани/органа, стадии развития растения и внешних стимулов, включая воздействие стрессовых факторов, фитогормонов, элиситоров и пр. (Koch, 2004; Roitsch, González, 2004; Proels, Roitsch, 2009). К распределению сахарозы по растительным тканям и органам и передаче сигнала имеют отношение инвертазы клеточной стенки, тогда как в накоплении сахаров и осморегуляции участвуют вакуолярные инвертазы (Roitsch, González, 2004; González et al., 2005). Образующиеся при гидролизе сахарозы гексозы попадают в клетки запасующих тканей с помощью транспортеров гексоз (Proels, Roitsch, 2009).

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) представляет собой одну из самых популярных в мире овощных культур. Плоды томата в процессе созревания накапливают глюкозу и фруктозу (Beckles et al., 2012), которые влияют на сладость плода. Количество этих гексоз регулируется совместной активностью сахарозосинтаз (обратимый гидролиз сахарозы), инвертаз (необратимый гидролиз сахарозы), ингибиторов инвертаз, а также транспортерами сахаров (Kawaguchi et al., 2021; Wang B. et al., 2021). Помимо определения вкуса плодов, растворимые сахара вносят значительный вклад в регуляцию стрессоустойчивости растения томата в процессе роста и развития (Proels, Roitsch, 2009). Повышенное привлечение углеводов к проблемному участку дает энергию для защитных реакций,

включая стимуляцию накопления углеводов и модуляцию экспрессии соответствующих генов, в том числе генов инвертаз и транспортеров сахаров (Proels, Roitsch, 2009). В условиях биотического стресса наблюдается скоординированная индукция экспрессии генов переносчика моносахаридов и инвертазы клеточной стенки (Fotopoulos et al., 2003; Voegelé et al., 2006), что подтверждает важную роль апопластного расщепления сахарозы в опосредовании защитных реакций. Независимо от процесса, и метаболизм, и распределение сахаров, а следовательно, и экспрессия задействованных генов контролируются циркадными ритмами, в частности суточными колебаниями интенсивности биологических процессов (González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

Среди инвертаз томата наиболее значимую роль выполняют инвертаза клеточной стенки *LIN6* (*Wiv-1*) (Proels, Roitsch, 2009) и вакуолярная инвертаза *TAI* (другие названия *AI*, *PAIN1*) (Elliott et al., 1993). Фермент *LIN6*, участвующий в росте растения и в ответе на различные стрессовые факторы, находится под контролем ключевых факторов циркадианного осциллятора (Proels, Roitsch, 2009; Zhang et al., 2013). Активность *TAI* связывают преимущественно с гидролизом сахарозы в плоде томата (Slugina et al., 2017). Информации о возможной зависимости экспрессии гена *TAI* от циркадных ритмов в растениях томата в литературе не найдено. Однако можно предположить, что такая связь существует, основываясь на данных для вакуолярной инвертазы сахарной свеклы *Beta vulgaris* (González et al., 2005).

Среди транспортеров гексоз у томата наиболее известны белки *STP1* и *STP2*. Нокдаун кодирующих их генов приводит к сокращению количества глюкозы и фруктозы в корнях, что снижает чувствительность растения к заражению нематодами (Warnock et al., 2016). Особенно выделяют ген *STP1*, который считается мишенью доместикации в геноме томата и отсутствие экспрессии которого приводит к снижению плодоношения и количества сахаров в плоде (Wang Y. et al., 2023). Свидетельств зависимости экспрессии гена от циркадианного осциллятора в литературе не имеется. Тем не менее, как и для инвертаз, подобная связь может иметь место.

В настоящей работе была определена зависимость динамики экспрессии генов вакуолярной инвертазы *TAI*,

инвертазы клеточной стенки *LIN6* и транспортера гексоз *STP1*, а также содержания растворимых сахаров (сахарозы, глюкозы, фруктозы) от суточного ритма в процессе роста растения томата. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата.

Материалы и методы

Для исследования использовали растения томата *S. lycopersicum* сорта Корнеевский селекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО, Московская область). Сорт среднеспелый, высокосахаристый, для закрытого грунта, устойчив к различным стрессовым факторам, включая колебания температуры и фотопериода (код сорта 8262334, <https://gossortrf.ru/registry/>).

Растения томата сорта Корнеевский были выращены до стадии плодоношения в 2023 г. в тепличных условиях ФНЦО. Собранные семена использовали в 2024 г. для получения растений в стадии 5–7 листьев (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН) в условиях длинного фотопериода и оптимальной температуры (день/ночь – 16 ч/8 ч, 23 °C/21 °C; световая фаза с 7:00 до 23:00; освещенность 190 мкМ/(м²·с)). Листовые пробы (по два растения на каждую временную точку анализа) отбирали в течение суток в шести точках: 1 ч до (6:00) и после (8:00) наступления дневной фазы; середина дневной фазы (15:00); 1 ч до (22:00) и после (24:00) наступления темновой фазы; середина темновой фазы (3:00). Тканевый материал измельчали в жидком азоте и использовали для анализа содержания растворимых сахаров и уровня экспрессии генов инвертаз (*TAI*, Solyc03g083910; *LIN6*, Solyc10g083290) и транспортера гексоз (*STP1*, Solyc02g079220).

Концентрацию растворимых сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) (мг/100 г сырой массы) определяли с помощью тестов Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия).

Предварительный анализ профиля экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в различных органах растения томата проводили *in silico* с использованием транскриптомных данных для сорта Micro-Tom *S. lycopersicum* (база данных TomExpress; <http://tomexpress.toulouse.inra.fr/login/>) (Zouine et al., 2017). Визуализацию данных осуществляли с помощью программы для построения тепловых карт (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) на основании значений ФРКМ (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments; TomExpress).

Для анализа экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) суммарную РНК выделяли из 0.2–0.5 г собранного листового материала и очищали от примесей ДНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия). Полученную РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли флуориметрически (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, США; Qubit RNA HS Assay Kit, Invitrogen, США). Подбор праймеров для ПЦР-РВ осуществляли посредством структурного анализа последовательностей анализируемых генов *S. lycopersicum*

и их транскриптов (доступны в базах данных: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <https://solgenomics.net/>) с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Были подобраны праймеры для ПЦР-РВ к генам *LIN6* (5'-ttccgatgcctcaaggcaag-3', 5'-cacgttttctcctcagaccaca-3') и *STP1* (5'-tgctcagaatgttctatgctc-3', 5'-gtgctcctctgtattgtatgg-3'). Для гена *TAI* использовали разработанные нами ранее последовательности праймеров (Slugina et al., 2017). Реакционная смесь для ПЦР-РВ включала 3 нг кДНК, специфичные праймеры и “2.5x Реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ ставили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США); программа: 5 мин при 95 °C, 40 циклов (15 с при 95 °C; 40 с при 60 °C). Данные нормализовали на экспрессию двух референсных генов *Expressed* (SGN-U346908) и *actin2/7* (NM_001330119.1) (Efremov et al., 2020). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах.

Результаты анализа содержания сахаров (мг/100 г сырой массы) и экспрессии генов статистически обрабатывали с помощью GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Значимость ($p < 0.05$) различий между значениями, полученными для временных точек, определяли, используя Two-way ANOVA (“multiple comparisons, corrected with Bonferroni test”).

Результаты

В данной работе на примере томата сорта Корнеевский (*S. lycopersicum*) было охарактеризовано суточное изменение содержания растворимых сахаров и профиля экспрессии генов двух ключевых инвертаз (вакуолярной, *TAI*; клеточной стенки, *LIN6*) и транспортера сахаров (*STP1*) в листьях растения, находящегося в активной стадии вегетативного роста и развития (5–7 листьев).

Поскольку растения *S. lycopersicum* нейтральны к фотопериоду (Lifschitz, Eshed, 2006), был использован характерный для летнего времени длинный фотопериод (16 ч день/8 ч ночь). Измерения проводили в шести временных точках: 1 ч до и 1 ч после наступления светового периода (6:00, 8:00); 1 ч до и 1 ч после наступления темнового периода (22:00, 24:00), в середину темнового (3:00) и светового (15:00) периодов.

В этих точках было измерено содержание растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) (рис. 1). Показано, что в начале светового периода количество всех анализируемых сахаров минимально. К середине дня (15:00) оно повышается в ~1.2–2.0 раза, а к концу (22:00) – резко увеличивается в ~15 раз (vs. 8:00), достигая дневного максимума. В начале темновой фазы (24:00) содержание гексоз продолжает расти в ~1.3–1.6 раза vs. 22:00, однако во второй половине темнового периода (3:00, 6:00) снижается в ~1.5–2.0 раза vs. 24:00. В начале светового периода (8:00) количество гексоз уменьшается еще более резко (в ~50–60 раз vs. 6:00) (см. рис. 1).

Содержание сахарозы в течение суток изменяется сходным с гексозами образом, за исключением точки 24:00 (снижение в ~2 раза vs. 22:00) и более плавного по срав-

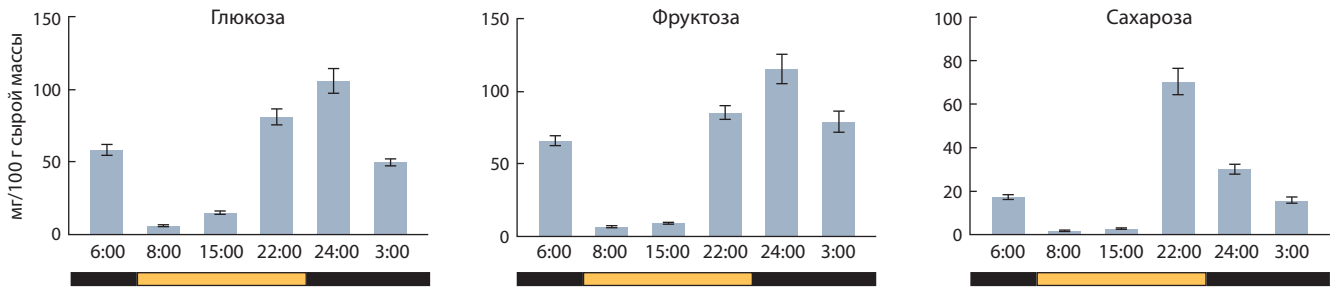


Рис. 1. Суточное изменение содержания глюкозы, фруктозы и сахарозы в листе растения томата сорта Корнеевский (*S. lycopersicum*).

Значения концентрации сахаров в разные временные точки различаются достоверно ($p < 0.05$), за исключением: глюкоза (6:00 vs. 3:00; 8:00 vs. 15:00); фруктоза (6:00 vs. 22:00; 8:00 vs. 15:00; 6:00 vs. 3:00; 22:00 vs. 3:00); сахароза (6:00 vs. 3:00; 8:00 vs. 15:00).

нению с гексозами уменьшения в точке 8:00 (в ~18 раз vs. 6:00) (см. рис. 1).

Таким образом, содержание анализируемых растворимых сахаров минимально в начале и максимально в конце светового периода, тогда как в темновой фазе их количество более постоянно.

Далее была охарактеризована экспрессия генов *LIN6*, *STP1* и *TAI*. Предварительно анализ органоспецифичной экспрессии этих генов *in silico* (рис. 2) показал, что мРНК всех трех генов присутствует в вегетативных тканях и в растущем плоде, включая стадию достижения финального размера плода и начала смены его окраски (Breaker, BR). В созревающем плоде (стадии оранжевой (Orange, OR) и красной (Red Ripe, RR) окраски) обнаруживались лишь следовые количества транскриптов генов *LIN6* и *STP1* (0.002–0.0129 FPKM).

В то же время ген *TAI* экспрессировался в данных тканях наиболее интенсивно. Пик экспрессии *TAI* (26.95–35.71 FPKM) соответствовал стадии OR созревания плода, на которой уровень транскриптов гена был примерно в 2 и 27–36 раз выше, чем в плоде на стадии RR (6.43–13.13 FPKM) и в вегетативных тканях/растущем плоде, включая стадию BR (0.20–1.15 FPKM), соответственно. В других репродуктивных тканях – бутонах, цветках и семенах плода RR – количество транскриптов *TAI* было выше примерно в 6–12, 20–40 и 50 раз соответственно, по сравнению с генами *LIN6* и *STP1* (см. рис. 2).

Несмотря на очевидную специфичность активности *TAI* к тканям спелого плода, уровень его экспрессии в вегетативных органах (0.20–1.15 FPKM) был в среднем выше, чем у *LIN6* (0.01–0.06 FPKM) и *STP1* (0.06–0.88 FPKM). В листе количество мРНК *TAI* было выше примерно в 2 и 27 раз, чем у *LIN6* и *STP1* соответственно. Уровень экспрессии *LIN6* в листе был самым низким: примерно в 12 раз ниже, чем у *STP1* (см. рис. 2).

Таким образом, *in silico* анализ профилей экспрессии генов показал, что по активности ген вакуолярной инвертазы *TAI* значительно превосходит гены инвертазы клеточной стенки *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* во всех органах растения. Наиболее высокая экспрессия *TAI* была отмечена в репродуктивных органах, особенно в запасающих тканях спелого плода на стадиях OR и RR.

Последующий анализ был сфокусирован на определении уровня экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* методом ПЦР-РВ в шести временных точках в тех же образцах

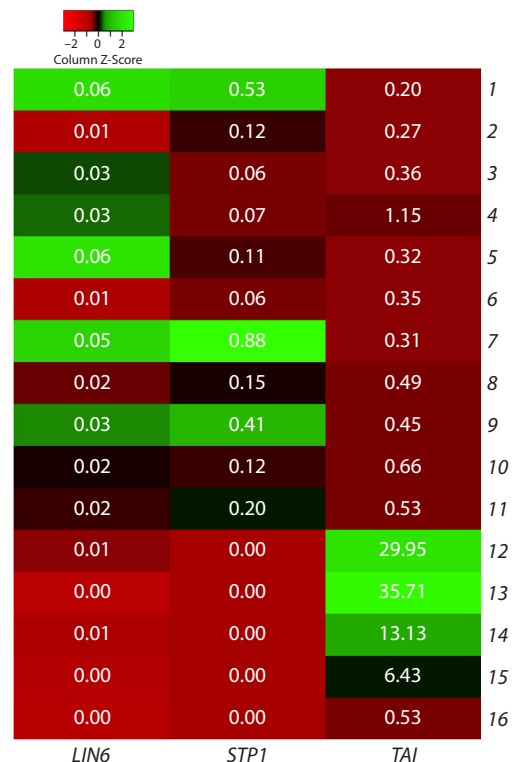


Рис. 2. Графическая визуализация (в виде тепловой карты) данных экспрессии генов *LIN6*, *STP1* и *TAI* в растении томата сорта Micro-Tom (*S. lycopersicum*), построенная по транскриптомным данным TomExpress (Zouine et al., 2017).

Анализируемые органы: корень (1); лист (2); бутон (3); цветок на стадии антезиса (4); плод – 4 дня после антезиса (дпа) (5); мякоть (6) и кожица (7) плода (10 дпа); мякоть (8) и кожица (9) плода (35 дпа); мякоть (10) и кожица (11) плода (38 дпа, BR); мякоть (12) и кожица (13) плода (41 дпа, OR); мякоть (14) и кожица (15) плода (44 дпа, RR); зрелые семена (16). Значения FPKM округлены до второго знака после запятой.

листьев сорта Корнеевский, в которых ранее измерялось содержание растворимых сахаров. В результате показано, что все три гена экспрессируются во всех шести временных точках. Наиболее высокие относительные уровни транскриптов в среднем наблюдались для гена *LIN6*, наиболее низкие – для *STP1*. Для гена *TAI*, вопреки ожиданиям, основанным на *in silico* данных (см. рис. 2), получены значения, на порядок более низкие, чем для *LIN6*, и лишь в 3–4 раза более высокие, чем для *STP1* (рис. 3).

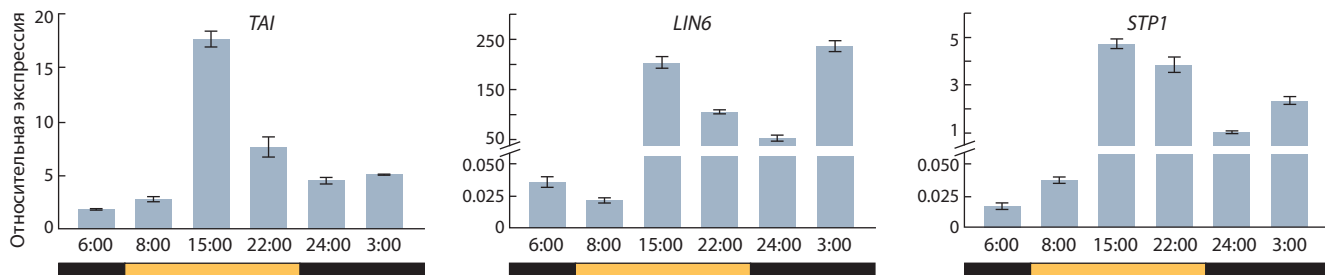


Рис. 3. Профиль экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* по данным ПЦР-РВ.

Значения уровней экспрессии по каждому из генов в анализируемых временных точках различаются достоверно ($p < 0.05$), за исключением: *TAI* (6:00 vs. 8:00; 24:00 vs. 3:00), *LIN6* (6:00 vs. 8:00), *STP1* (6:00 vs. 8:00).

В целом профиль экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в течение суток оказался сходным. Уровень транскриптов значительно возрастал от начала (8:00) к середине (15:00) световой фазы: в ~ 7 раз для *TAI*, ~ 7000 раз для *LIN6* и ~ 128 раз для *STP1*. Затем он снижился в ~ 1.2 – 2.5 раза (22:00 vs. 15:00) к ее окончанию и в ~ 2 – 3.5 раза (24:00 vs. 22:00) в начале темновой фазы. К середине ночи уровень экспрессии генов повышался в ~ 2 – 5 раз (3:00 vs. 24:00) и к концу темновой фазы снижился в ~ 2.5 раза для *TAI*, ~ 7000 раз для *LIN6* и ~ 183 раза для *STP1* (6:00 vs. 3:00) (см. рис. 3).

Таким образом, динамика суточных колебаний уровня экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* была сходной, однако значительно более выраженной в случае *LIN6* и *STP1* по сравнению с *TAI*. Уровень экспрессии *LIN6* и *STP1* был следовым в предутренний период и в начале дня, а *TAI* — относительно постоянным и более существенным.

Обсуждение

Растворимые моно- и дисахариды оказывают значительное влияние на рост и развитие растений (Proels, Roitsch, 2009; Lemoine et al., 2013). Их содержание (помимо синтеза/распада гликанов) регулируется гидролизом сахарозы под действием сахарозосинтаз, инвертаз и ингибиторов инвертаз, а также переносом между тканями с помощью транспортеров (Kawaguchi et al., 2021; Wang B. et al., 2021).

Растворимые сахара играют важную роль во всех процессах онтогенеза растений, в том числе томата (Proels, Roitsch, 2009). Более того, при стрессах повышенный приток углеводов к проблемным участкам дает энергию для защитных реакций, включая скоординированную стимуляцию накопления углеводов и экспрессии генов инвертаз и транспортеров сахаров (Fotopoulos et al., 2003; Voegelé et al., 2006; Proels, Roitsch, 2009; Bolouri Moghaddam, Van den Ende, 2013).

В любом процессе, протекающем в растении при участии растворимых сахаров, и содержанию сахаров, и интенсивности экспрессии соответствующих генов присутствуют суточные синхронные циклические колебания под контролем циркадианного осциллятора (González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

В нашем исследовании была проанализирована суточная динамика количества растворимых сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы) в листьях растений томата сорта Корнеевский. Точки измерения охватывали пограничные периоды между темновой и световой фазами (6:00, 8:00,

22:00, 24:00) и середины фаз (15:00, 3:00). В этих же точках была определена экспрессия генов вакуолярной инвертазы (*TAI*), инвертазы клеточной стенки (*LIN6*) и транспортера гексоз (*STP1*), роль которых в метаболизме сахаров у томата особенно важна (Elliott et al., 1993; Proels, Roitsch, 2009; Warnock et al., 2016; Slugina et al., 2017).

Полученный суточный профиль содержания сахаров (см. рис. 1) находится в соответствии с активным синтезом сахарозы в дневной фазе фотосинтеза, а также с суточным циклом расходования/поступления сахаров за счет синтеза/распада транзитного крахмала днем/ночью (Haydon et al., 2011). В течение световой фазы происходит постепенное накопление сахарозы, глюкозы и фруктозы (см. рис. 1). Часть глюкозы, предположительно, расходуется на синтез транзитного крахмала. Одновременно из листьев как источников сахаров идет их отток в запасящие органы (в данном случае в корни растений). К концу дня количество сахаров достигает наивысших значений, а в темновой фазе снижается (не сразу) и поддерживается на относительно постоянном уровне (см. рис. 1) из-за остановки синтеза сахарозы и активации процесса распада транзитного крахмала (Koch, 2004; Haydon et al., 2011).

Основным результатом характеристики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1*, проведенной *in silico* (см. рис. 2), стало подтверждение показанной ранее важной роли гена вакуолярной инвертазы *TAI* в гидролизе сахарозы в запасящей ткани спелого плода (Elliott et al., 1993; Slugina et al., 2017). Кроме того, более высокий уровень мРНК *TAI* в сравнении с *LIN6* позволил предположить и наибольшую важность *TAI* для процесса в вегетативной ткани. Существенное присутствие транскриптов гена инвертазы клеточной стенки *LIN6* в вегетативной ткани коррелирует с данными о значимости *LIN6* для вегетативного роста растения (Proels, Roitsch, 2009; Zhang et al., 2013). Также наличие мРНК *LIN6* и гена транспортера сахаров *STP1* в вегетативной ткани (см. рис. 2) согласуется с участием перечисленных генов в стрессовом ответе растения (Proels, Roitsch, 2009; Warnock et al., 2016). При этом следовые количества транскриптов *STP1* в спелом плоде сорта Микро-Том (см. рис. 2) с учетом его высокой сахаристости и показанной прямой ассоциации экспрессии *STP1* с количеством сахаров в плоде (Wang Y. et al., 2023) предполагают, что для реализации зависимости достаточно даже невысокой активности указанного гена.

Последующий анализ суточной динамики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в листе томата сорта Корнеевский

показал, что активность всех трех генов изменяется сходным образом и связана с циркадным ритмом (см. рис. 3). Суточная динамика экспрессии *TAI* согласуется с показанной ранее суточной динамикой для гена вакуолярной инвертазы *B. vulgaris* (González et al., 2005): у обоих генов пик экспрессии приходится на середину световой фазы.

В отличие от *TAI*, ген инвертазы клеточной стенки *LIN6* имеет еще один максимум экспрессии – в середине ночи. Вопреки ожиданиям в соответствии с данными *in silico* (см. рис. 2), уровень транскриптов *LIN6* был на порядок выше, чем у *TAI* (см. рис. 3). Возможно, это объясняется тем, что в анализе *in silico* базы данных (Zouine et al., 2017) использовались более взрослые растения и, следовательно, более старые листья с крупными вакуолями в клетках. В нашем случае тестировались молодые растения в стадии 5–7 листьев, в клетках которых содержатся мелкие вакуоли, что позволяет предположить более активные апопластные процессы гидролиза сахарозы и транспорта сахаров. В пользу этого говорят и существенно более резкие (на порядок) суточные колебания экспрессии *LIN6* и *STP1* в сравнении с *TAI* (см. рис. 3).

Заключение

В нашей работе была определена суточная динамика содержания растворимых сахаров и экспрессии генов ферментов гидролиза сахарозы (инвертазы *TAI*, *LIN6*) и белков переноса сахаров (транспортер *STP1*) в растениях томата сорта Корнеевский. Показано, что как содержание сахаров, так и уровень транскриптов генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* находятся в зависимости от циркадного ритма и соответствуют биологическим процессам, протекающим в растении в разные периоды суток. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата и могут быть использованы при прогнозировании стрессоустойчивости растений в процессе селекции данной культуры.

Список литературы / References

Beckles D.M., Hong N., Stamova L., Luengwilai K. Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review. *Fruits*. 2012;67:49-64. doi 10.1051/fruits/2011066

Bolouri Moghaddam M.R., Van den Ende W. Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J. Exp. Bot.* 2013;64(6):1439-1449. doi 10.1093/jxb/ert046

Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Plants*. 2020;9:1169. doi 10.3390/plants9091169

Elliott K.J., Butler W.O., Dickinson C.D., Konno Y., Vedvick T.S., Fitzmaurice L., Mirkov T.E. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 1993;21(3):515-524. doi 10.1007/BF00028808

Fotopoulos V., Gilbert M.J., Pittman J.K., Marvier A.C., Buchanan A.J., Sauer N., Hall J.L., Williams L.E. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atβfruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 2003;132(2):821-829. doi 10.1104/pp.103.021428

González M.C., Roitsch T., Cejudo F.J. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar

beet plants. *Planta*. 2005;222(2):386-395. doi 10.1007/s00425-005-1542-4

Haydon M.J., Bell L.J., Webb A.A. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *J. Exp. Bot.* 2011;62(7):2333-2348. doi 10.1093/jxb/err040

Kawaguchi K., Takei-Hoshi R., Yoshikawa I., Nishida K., Kobayashi M., Kusano M., Lu Y., Ariizumi T., Ezura H., Otagaki S., Matsumoto S., Shiratake K. Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21534. doi 10.1038/s41598-021-00966-4

Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004;7:235-246. doi 10.1016/j.pbi.2004.03.014

Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 2013;4:272. doi 10.3389/fpls.2013.00272

Lifschitz E., Eshed Y. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J. Exp. Bot.* 2006;57(13):3405-3414. doi 10.1093/jxb/erl106

Proels R.K., Roitsch T. Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *J. Exp. Bot.* 2009;60(6):1555-1567. doi 10.1093/jxb/erp027

Roitsch T., González M.-C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 2004;9:606-613. doi 10.1016/j.tplants.2004.10.009

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006;57:675-709. doi 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441

Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. *TAI* vacuolar invertase orthologs: the interspecific variability in tomato plants (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Mol. Genet. Genomics*. 2017;292(5):1123-1138. doi 10.1007/s00438-017-1336-y

Voegele R.T., Wirsal S., Möll U., Lechner M., Mendgen K. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006;19(6):625-634. doi 10.1094/MPMI-19-0625

Wang B., Li N., Huang S., Hu J., Wang Q., Tang Y., Yang T., Asmutola P., Wang J., Yu Q. Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated *SIINVINH1* and *SIVPE5* gene editing. *PeerJ*. 2021;9:e12478. doi 10.7717/peerj.12478

Wang Y., Shi C., Ge P., Li F., Zhu L., Wang Y., Tao J., Zhang X., Dong H., Gai W., Wang F., Ye Z., Grierson D., Xu W., Zhang Y. A 21-bp InDel in the promoter of *STP1* selected during tomato improvement accounts for soluble solid content in fruits. *Hortic. Res.* 2023;10(3):uhad009. doi 10.1093/hr/uhad009

Warnock N.D., Wilson L., Canet-Perez J.V., Fleming T., Fleming C.C., Maule A.G., Dalzell J.J. Exogenous RNA interference exposes contrasting roles for sugar exudation in host-finding by plant pathogens. *Int. J. Parasitol.* 2016;46(8):473-477. doi 10.1016/j.ijpara.2016.02.005

Zhang Y.L., Zhang A.H., Jiang J. Gene expression patterns of invertase gene families and modulation of the inhibitor gene in tomato sucrose metabolism. *Genet. Mol. Res.* 2013;12(3):3412-3420. doi 10.4238/2013.January.24.1

Zouine M., Maza E., Djari A., Lauvernier M., Frasse P., Smouni A., Pirrello J., Bouzayen M. TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant J.* 2017;92(4):727-735. doi 10.1111/tj.13711

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.07.2024. После доработки 17.09.2024. Принята к публикации 17.09.2024.