


## Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты

Д.Ю. Тяпкина<sup>1</sup>, Е.З. Кочиева<sup>1,2</sup>, М.А. Слугина<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

 e-mail: mashinmail@mail.ru

L-аскорбиновая кислота (витамин С) – вторичный метаболит растений, выполняющий множество разнообразных функций как в растительных тканях, так и в организме человека. Основным источником витамина С в питании человека служат растения, и прежде всего плоды цитрусовых, шиповника, перца, смородины, томата, клубники, папайи, киви. Однако, несмотря на то что L-аскорбиновая кислота – важное биологически активное вещество, путь ее биосинтеза в растительной клетке был описан лишь в 2007 г. на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*. В настоящем обзоре рассмотрены известные на сегодняшний день пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в тканях растений. Это L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый пути. Наиболее изучен из них L-галактозный путь (путь Смирнова–Уилера), для которого определены все ферменты, катализирующие последовательную цепь реакций. Для других путей известна лишь предположительная последовательность метаболитов, при этом многие ферменты, катализирующие их превращение, еще не выявлены. Выделены ключевые гены, которые участвуют в биосинтезе и накоплении аскорбиновой кислоты в сочных плодах. Среди них ферменты L-галактозного пути (ГДФ-маннозофосфорилаза (GMP, VTC1), ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза (GME), ГДФ-L-галактозофосфорилаза (GGP, VTC2/VTC5), L-галактозо-1-фосфатфосфатаза (GPP/VTC4), L-галактозо-1-дегидрогеназа (GalDH) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (GalLDH)); ферменты D-галактуронового пути (NADPH-зависимая D-галактуронатредуктаза (GalUR)) и ферменты рециркуляции АК (дегидроаскорбатредуктаза (DHAR1) и монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR)). До сих пор нет однозначного описания всех путей биосинтеза и накопления L-аскорбиновой кислоты в плодах. В настоящее время нельзя однозначно утверждать, что какой-то из четырех известных путей биосинтеза аскорбиновой кислоты является преобладающим в плодах растений. Так, в плодах персика и киви основным является L-галактозный путь, тогда как в плодах винограда и клубники – по всей видимости, D-галактуроновый. В то же время у ряда растений, например цитрусовых или томата, по мере созревания плодов может происходить смена различных путей биосинтеза. Отмечается, что уровни накопления аскорбиновой кислоты зависят не только от биосинтеза, но и от скорости ее окисления и рециркуляции.

Ключевые слова: L-аскорбиновая кислота; витамин С; плоды; метаболизм; гены биосинтеза аскорбиновой кислоты.


**Для цитирования:** Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):270-280. DOI 10.18699/VJ19.492

## Vitamin C in fleshy fruits: biosynthesis, recycling, genes, and enzymes

D.Y. Tyapkina<sup>1</sup>, E.Z. Kochieva<sup>1,2</sup>, M.A. Slugina<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

 e-mail: mashinmail@mail.ru

L-ascorbic acid (vitamin C) is a plant secondary metabolite that has a variety of functions both in plant tissues and in the human body. Plants are the main source of vitamin C in human nutrition, especially citrus, rose hip, tomato, strawberry, pepper, papaya, kiwi, and currant fruits. However, in spite of the biological significance of L-ascorbic acid, the pathways of its biosynthesis in plants were fully understood only in 2007 by the example of a model plant *Arabidopsis thaliana*. In the present review, the main biosynthetic pathways of vitamin C are described: the L-galactose pathway, L-gulose pathway, galacturonic and myo-inositol pathway. To date, the best studied is the L-galactose pathway (Smyrnoff–Wheeler pathway). Only for this pathway all the enzymes and the entire cascade of reactions have been described. For other pathways, only hypothetical metabolites are proposed and not all the catalyzing enzymes have been identified. The key genes participating in ascorbic acid biosynthesis and accumulation in fleshy fruits are highlighted. Among them are L-galactose pathway proteins (GDP-mannose phosphorylase (GMP, VTC1), GDP-D-mannose epimerase (GME), GDP-L-galactose phosphorylase (GGP, VTC2/VTC5), L-galactose-1-phosphate phosphatase (GPP/VTC4), L-galactose-1-dehydrogenase (GalDH), and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)); D-galac-

turonic pathway enzymes (NADPH-dependent D-galacturonate reductase (GalUR)); and proteins, controlling the recycling of ascorbic acid (dehydroascorbate reductase (DHAR1) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR)). Until now, there is no clear and unequivocal evidence for the existence of one predominant pathway of vitamin C biosynthesis in fleshy fruits. For example, the L-galactose pathway is predominant in peach and kiwi fruits, whereas the D-galacturonic pathway seems to be the most essential in grape and strawberry fruits. However, in some plants, such as citrus and tomato fruits, there is a switch between different pathways during ripening. It is noted that the final ascorbic acid content in fruits depends not only on biosynthesis but also on the rate of its oxidation and recirculation. Key words: L-ascorbic acid; vitamin C; fruits; metabolism; the key genes of ascorbic acid biosynthesis.

**For citation:** Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Vitamin C in fleshy fruits: biosynthesis, recycling, genes, and enzymes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):270-280. DOI 10.18699/VJ19.492 (in Russian)

## Введение

L-аскорбиновая кислота (витамин С) – вторичный метаболит растений, выполняющий множество разнообразных функций в клетке (Davey et al., 2000; Iqbal et al., 2009; Smirnoff, 2018). Она играет роль регулятора экспрессии многих генов, через фитогормоны воздействует на процессы роста и развития растений и, что не менее важно, участвует в формировании ответа растительной клетки на биотические и абиотические стрессовые факторы (Pastori et al., 2003; Gest et al., 2013; Li et al., 2013). У некоторых видов растений соли аскорбиновой кислоты (АК) могут использоваться в качестве субстрата для биосинтеза других метаболитов, например солей щавелевой и винной кислот (Loewus F.A., Loewus M.W., 1987; Loewus F.A., 1999; Cruz-Rus et al., 2010).

Витамин С представляет особую ценность в рационе человека, так как из-за произошедшей мутации в одном из ферментов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты человек и другие высшие приматы утратили возможность вырабатывать ее самостоятельно (Nishikimi, Yagi, 1996). Являясь коферментом ряда метаболических процессов, витамин С играет значимую роль для нормального функционирования организма: обладает антиоксидантными свойствами, устраняет свободные радикалы – одну из причин онкогенеза и старения организма (Figueroa-Méndez, Rivas-Arancibia, 2015); улучшает иммунитет человека за счет активации фагоцитарных клеток; предотвращает сердечно-сосудистые заболевания, связанные с атеросклерозом; способствует образованию коллагена и развитию хрящевой ткани (Diplock et al., 1998). Основным источником витамина С в питании человека служат растения. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты содержится в плодах citrusовых, шиповника, актинидии (киви), облепихи, папайи, клубники, рябины, перца, томата (Iqbal et al., 2009; Стрельцина и др., 2010).

## Биосинтез аскорбиновой кислоты в растительной клетке

Несмотря на несомненную важность аскорбиновой кислоты для жизни растений и здоровья человека, ее биосинтез в растительной клетке окончательно был описан лишь в 2007 г. на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Linster et al., 2007). В отличие от животных, которые синтезируют L-аскорбиновую кислоту из глюконовой, в растительной клетке существует по меньшей мере четыре альтернативных пути ее биосинтеза: L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый пути (см. рисунок) (Li et al., 2010; Yang et al., 2011).

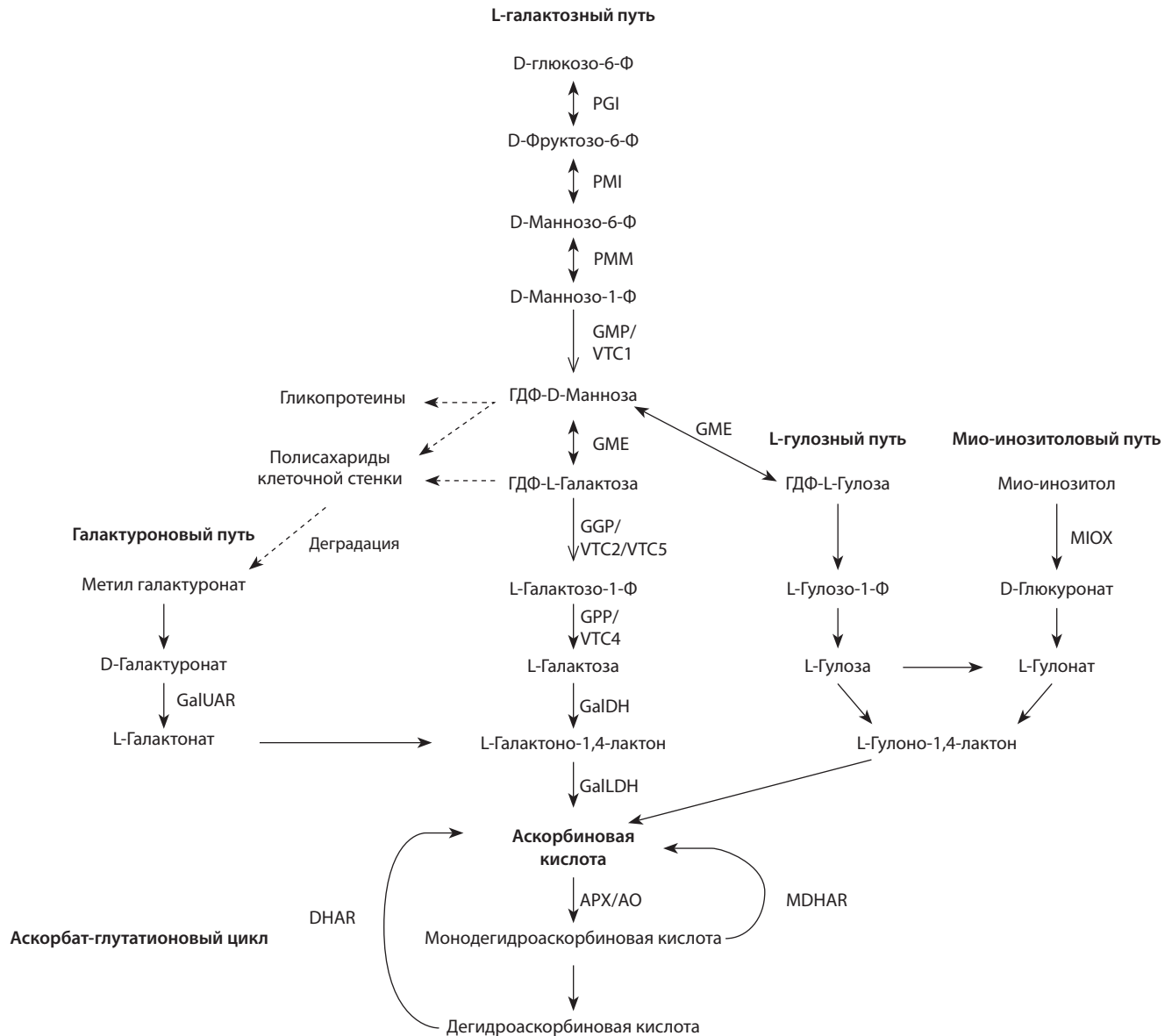
## L-галактозный путь

На сегодняшний день L-галактозный путь, или путь Смирнова–Уилера (Wheeler et al., 1998), считается основным способом биосинтеза L-аскорбиновой кислоты у растений и включает десять последовательных стадий. Начальным субстратом служит молекула глюкозы. При этом первые восемь стадий нужны для того, чтобы преобразовать D-глюкозу в L-галактозу, которая отличается от D-глюкозы только пространственным расположением водородной и гидроксильной групп у четвертого атома углерода (Linster et al., 2007).

Важными метаболитами данного пути являются ГДФ-D-манноза и ГДФ-L-галактоза. Их взаимопревращение контролируется ферментом ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразой (GME). Стоит отметить, что основная часть продуктов этой реакции расходуется на реакции первичного метаболизма, а именно на биосинтез полисахаридов клеточной стенки (Roberts, 1971; Baydoun, Fry, 1988), который максимально активен в растущих органах и тканях. Из этого следует, что начальные этапы метаболического пути в основном задействованы во время роста органов (листьев, плодов и т.д.). В уже сформировавшихся (зрелых) органах происходит переключение на реакции вторичного метаболизма, и осуществляется дальнейшее превращение ГДФ-L-галактозы в аскорбиновую кислоту. Поэтому лимитирующим этапом на данном метаболическом пути синтеза витамина С считается последующая реакция, которая приводит непосредственно к синтезу L-аскорбиновой кислоты и кодируется ферментом ГДФ-L-галактозофосфорилазой (VTC2) (см. рисунок). Именно работа VTC2 имеет ключевое значение для образования витамина С, активность которого, в свою очередь, зависит от наличия у клетки потребности в синтезе полисахаридов клеточной стенки (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014).

## L-гулозный путь

На примере арабидопсиса было показано, что один из ферментов вышеописанного пути – ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза – помимо 3',5'-изомеразной активности, превращающей ГДФ-D-маннозу в ГДФ-L-галактозу, также может обладать только 5'-изомеразной активностью и катализировать реакцию превращения ГДФ-D-маннозы в ГДФ-L-гулозу (Wolucka, Van Montagu, 2003). Далее было предположено, что ГДФ-L-гулоза в ходе последующего превращения в L-гулозо-1-фосфат, L-гулозу и L-гулоно-1,4-лактон может быть также превращена в L-аскорбиновую кислоту (см. рисунок). Однако соответствующие каталитические ферменты L-гулозного пути синтеза



Пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в клетках растений, по (Li et al., 2010; Suekawa et al., 2017), с модификациями.

витамина С у растений еще не найдены, за исключением L-гулоно-1,4-лактонооксидазы арабидопсиса (Maruta et al., 2010). Интересно, что сверхэкспрессия L-гулоно-1,4-лактонооксидазы крысы (ALO) повышала содержание L-аскорбиновой кислоты в табаке и салате (Jain, Nessler, 2000). У мутантного по гену *VTC* растения арабидопсиса, характеризующегося дефицитом витамина С, сверхэкспрессия крысиного *ALO* привела к полному восстановлению содержания L-аскорбиновой кислоты (Radzio et al., 2003). Из этого следует вывод, что L-гулозный путь можно рассматривать как один из альтернативных путей биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях.

#### Мио-инозитоловый путь

Мио-инозитол представляет собой углеводный метаболит, синтезируемый большинством клеток и необходимый для нормального роста и развития растений. В форме различных инозитолфосфатов и фосфатидинозитоловых

липидов мио-инозитол принимает участие в трансдукции внутриклеточных сигнальных каскадов (Michell, 2007).

Мио-инозитоловый путь биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях состоит из четырех ферментативных стадий (см. рисунок). Мио-инозитол окисляется мио-инозитолоксигеназой до D-глюкуроновой кислоты, которая затем при катализе глюкуронаредуктазой превращается в L-гулоновую кислоту, которая под воздействием фермента альдонолактоназы преобразуется в L-гулоно-1,4-лактон. Последней реакцией является превращение L-гулоно-1,4-лактона в молекулу L-аскорбиновой кислоты под воздействием фермента L-гулонолактондегидрогеназы (Lorence et al., 2004).

Ключевым ферментом данного пути считается мио-инозитолоксигеназа (MIOX). Так, на примере арабидопсиса было представлено, что сверхэкспрессия MIOX приводит к двукратному увеличению содержания витамина С в цветках и листьях (Lorence et al., 2004). Остальные

ферменты, осуществляющие последующие реакции у растений, к настоящему времени не определены.

### **D-галактуроновый путь**

В начале 1960-х гг. было показано, что метиловый эфир галактуроновой кислоты может превращаться в L-аскорбиновую кислоту. Впервые наличие данного метаболического пути было доказано с помощью радиометрического метода на примере простейшего *Euglena gracilis* (Shigeoka et al., 1979). В случае растений экзогенное добавление метилового эфира D-галактуроновой кислоты приводило к увеличению содержания АК в различных тканях и клеточной культуре арабидопсиса (Loewus, Kelly, 1961; Davey et al., 1999), что указывает на наличие у них данного пути синтеза аскорбиновой кислоты.

Стоит отметить, что начальными субстратами для D-галактуронового пути служат продукты разрушения полисахаридов клеточной стенки. D-галактуронозная кислота является необходимым элементом одновременно для двух биохимических процессов: синтеза пектинов – компонента клеточной стенки, и биосинтеза АК. Считается, что этот путь состоит из нескольких ключевых ферментативных стадий, которые заключаются в восстановлении D-галактуронозной кислоты галактуронатредуктазой до L-галактонозой кислоты или L-галактоно-1,4-лактона с последующим образованием L-аскорбиновой кислоты (см. рисунок). Важная роль данного метаболического пути показана для плодов таких растений, как клубника (Agius et al., 2003), виноград (Cruz-Rus et al., 2010), апельсин (Xu et al., 2013), яблоко (Mellidou et al., 2012). Поскольку D-галактуронозный путь значительно короче, чем L-галактозный, считающийся основным путем биосинтеза АК у большинства изученных растений, предполагают, что он может быть дополнительным путем в плодах при воздействии стресса (Cruz-Rus et al., 2011).

### **Рециркуляция АК (аскорбат-глутатионовый цикл)**

Современный массив данных, накопленный в ходе изучения метаболизма АК в растительных тканях, показывает, что уровни ее конечного содержания зависят не только от биосинтеза, но также от окисления и последующей рециркуляции (Li et al., 2013).

Образовавшаяся в ходе одного из четырех вышеописанных циклов биосинтеза L-аскорбиновая кислота в растительной клетке выступает в качестве антиоксиданта, защищая ее от окислительного стресса (Akram et al., 2017). При этом образуются окисленные формы (монодегидроаскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты). В ходе рециркуляции окисленные формы восстанавливаются обратно до аскорбиновой кислоты при помощи двух редуктаз: монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR). Данный цикл известен как аскорбат-глутатионовый цикл (см. рисунок). Биологическая функция его существования обусловлена наличием в клетке активных форм кислорода, с одной стороны, и антиоксидативным свойством АК, с другой.

Первым этапом этого пути является детоксикация активных форм кислорода с помощью аскорбатпероксидазы (APX) или аскорбатоксидазы (АО). В результате образуется монодегидроаскорбиновая кислота, которая

восстанавливается обратно до АК монодегидроаскорбатредуктазой, либо дегидроаскорбиновая кислота, которая восстанавливается дегидроаскорбатредуктазой.

Таким образом, конечное содержание АК в органах и тканях растений зависит как от ее биосинтеза, так и от процесса рециркуляции.

### **Особенности биосинтеза и накопления аскорбиновой кислоты в плодах**

L-аскорбиновая кислота выполняет множество разнообразных функций в жизни растительного организма. Процессы ее биосинтеза запускаются в ответ на разнообразные эндогенные и экзогенные воздействия и происходят практически во всех тканях и органах растений. Поэтому неудивительно наличие как минимум четырех путей синтеза аскорбиновой кислоты, переключение между которыми происходит в зависимости от конкретных потребностей и условий внутри клетки. Однако для человека наиболее интересен механизм накопления витамина С именно в съедобных частях растений, поэтому необходимо четко понимать, какой из метаболических путей синтеза АК имеет первоочередное значение в плодах различных видов растений. Несмотря на интерес, который представляет данная тема, количество исследований, посвященных особенностям накопления витамина С в плодах растений, ограничено. В настоящее время достаточно подробно рассмотрены пути синтеза и аккумуляции витамина С в плодах на примере некоторых сельскохозяйственных культур, таких как клубника, томат, виноград, киви, яблоко, груша, черешня, цитрус (Agius et al., 2003; Hancock et al., 2007; Bulley et al., 2009; Cruz-Rus et al., 2010; Di Matteo et al., 2010; Li et al., 2010; Walker et al., 2010; Vadejo et al., 2012; Alós et al., 2014).

Как правило, накопление АК происходит постепенно, по мере увеличения массы растущего плода. Наиболее быстро этот процесс осуществляется в период 75–100 дней после антезиса. Такой паттерн аккумуляции АК показан, например, у томата (Ioannidi et al., 2009). В то же время в плодах киви (Bulley et al., 2009) и черной смородины (Hancock et al., 2007) АК быстрее всего накапливается на ранних стадиях развития плодов, когда биосинтетическая активность клеток максимальная (Li et al., 2011).

Для некоторых культур существенную роль играет основной (L-галактозный) путь. Так, исследование содержания витамина С в плодах черной смородины (*Ribes nigrum*) показало вариабельность данного признака в зависимости как от климатических условий, так и от генотипа. При этом только для одного гена ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразы наблюдалась корреляция экспрессии с накоплением витамина С (Walker et al., 2010).

В плодах киви (*Actinidia deliciosa*, сорт Qimmei) измерение накопления витамина С показало максимальное его содержание на 30-й день после антезиса и постепенное уменьшение содержания к 60-му дню. Анализ экспрессии ключевых генов показал сходные паттерны для большинства исследуемых генов, за исключением генов L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (GalLDH) и L-галактозо-1-фосфатфосфатазы (GPP/VTC4). С накоплением АК коррелировала только экспрессия GPP (Li et al., 2010).

Для плодов томата (*Solanum lycopersicum*), в которых содержание витамина С составляет до 35 мг на 100 г, также было выявлено важное значение ферментов D-галактуранового пути. При этом показано, что увеличение содержания АК по мере созревания плодов томата сорта Миссо-Том находится в обратной зависимости от экспрессии генов основного (L-галактозного) пути (Badejo et al., 2012). Обработка растений томата L-галактозой и D-галактураном приводила к повышению содержания витамина С в созревших плодах, что не достигалось при обработке L-гулоно-1,4-лактоном, образующимся в L-гулозном и мио-инозитоловом путях (см. рисунок) (Badejo et al., 2012). Из этого можно сделать вывод, что при созревании плодов томата синтез АК может начинаться с пути Смирнова–Уилера с последующим переключением на D-галактурановый путь, ферменты которого работают уже на стадии полного созревания плодов. Нарботка D-галактурановой кислоты обеспечивается за счет расщепления пектина клеточной стенки, поэтому можно считать, что путь активируется во время процесса размягчения плодов томата (Badejo et al., 2012). Ранее также было показано, что в интрогрессивной линии IL 12-4 (*S. pennellii* и *S. lycopersicum*), отличавшейся от родительской линии куда большим содержанием витамина С, очень высока экспрессия генов пектинэстераз и полигалактуроназ, функция которых заключается в разрушении пектинов. Это еще раз свидетельствует о непосредственном участии D-галактуранового пути в процессе накопления витамина С в плодах томата (Di Matteo et al., 2010).

Аскорбиновая кислота является крайне ценным метаболитом плодов винограда (*Vitis vinifera*), поскольку служит субстратом для синтеза винной кислоты (Cholet et al., 2016). Так же как и в плодах клубники и томата, содержание АК растет по мере созревания винограда, достигая максимума в полностью спелых ягодах. Анализ экспрессии генов, контролирующих различные пути биосинтеза АК в плодах винограда, выявил сильную корреляцию транскрипции гена D-галактуранатредуктазы (*GalUR*) с количественным содержанием витамина С (Cruz-Rus et al., 2010). Таким образом, D-галактурановый путь был предложен в качестве основного пути биосинтеза витамина С во время роста и созревания плодов винограда (Cruz-Rus et al., 2010).

Известно, что спелые плоды клубники (*Fragaria* sp.) богаты витамином С и содержат в среднем 60 мг АК на 100 г свежей ткани (Agius et al., 2003). Существенное значение для накопления АК имеет также D-галактурановый путь. Экспрессия одного из ферментов данного пути – NADPH-зависимой D-галактуранатредуктазы, в плодах клубники увеличивается пропорционально накоплению в них витамина С. Сверхэкспрессия гена *GalUR* клубники в листьях арабидопсиса привела к двукратному увеличению содержания в них витамина С, что свидетельствует о важной роли именно этого фермента в биосинтезе аскорбиновой кислоты (Agius et al., 2003).

Надо отметить, что конечное содержание витамина С в плодах зависит не только от скорости биосинтеза АК, но и от наличия процессов ее рециркуляции (см. рисунок). Так, на примере клубники было показано, что экспрессия гена аскорбат-глутатионного цикла *MDHAR* положительно

коррелирует с накоплением витамина С в растущих плодах (Cruz-Rus et al., 2011).

В плодах черешни (*Prunus avium*, сорт Hongdeng) наблюдалось максимальное содержание АК в период образования завязи и постепенное снижение во время созревания плода, но с небольшим увеличением в зрелом плоде (Liang et al., 2017). Тем не менее АК продолжала накапливаться по мере увеличения веса свежих плодов. Описаны полноразмерные кДНК десяти генов, участвующих в L-галактозном пути биосинтеза АК, и десяти генов, участвующих в рециркуляции АК. Уровни экспрессии генов ГДФ-L-галактозофосфорилазы (GGP2), L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (GalLDH), аскорбатпероксидазы (APX3), аскорбатоксидазы (AO2), глутатионредуктазы (GR1) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR1) коррелировали с количественным содержанием витамина С во время развития плода, что указывает на то, что работа всех этих генов биосинтеза, деградации и рециркуляции аскорбиновой кислоты совместно регулирует накопление АК в плодах черешни (Liang et al., 2017).

В плодах груши (*Pyrus pyrifolia*, сорт Aikansui) детально исследовались активности ферментов, участвующих в синтезе через путь Смирнова–Уилера и в процессе рециркуляции витамина С в различных тканях плода (Huang et al., 2013). Результаты биохимического анализа показали, что содержание АК увеличивалось по мере развития плодов и достигло максимума через 30 дней после антезиса, затем уменьшалось и поддерживалось на одном уровне. Наибольшая концентрация АК обнаружена в кожуре, что является следствием высокой активности GalLDH и GalLDH, с одной стороны, и DHAR и MDHAR, работающих в цикле рециркуляции АК, с другой. Экзогенное введение предшественников синтеза АК продемонстрировало, что кожура обладает более сильной способностью биосинтеза через путь Смирнова–Уилера и D-галактурановый путь, тогда как мякоть и сердцевина имели более низкую способность синтезировать аскорбиновую кислоту (Huang et al., 2013).

Было показано, что в плодах яблони (*Malus domestica*) АК может синтезироваться по L-галактозному пути (Li et al., 2008). При дальнейших исследованиях динамики накопления витамина С в процессе созревания плодов у сорта Gala найдено, что уровни транскрипции генов ГДФ-L-галактозофосфорилазы, ГДФ-маннозопирофосфорилазы, D-галактуранатредуктазы и регулируемой на посттранскрипционном уровне L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы не коррелировали с накоплением витамина С. В то же время паттерны экспрессии L-галактозодегидрогеназы, L-галактозо-1-фосфатфосфатазы и ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразы в целом были сходны с паттерном накопления АК. Интересно, что экспрессия и активность генов монодегидроаскорбатредуктазы и дегидроаскорбатредуктазы, разрушающих АК в плодах, не коррелировали с накоплением АК в процессе развития плодов (Li et al., 2011).

Также был проведен поиск локусов количественных признаков, отвечающих за накопление витамина С в плодах *M. domestica* (Mellidou et al., 2012). Выявлена группа сцепления, включающая гены *GGP* и *DHAR*. Особый интерес представляют три паралогичных гена *GGP*, все они

находятся внутри АК-QTL кластера. Была найдена ассоциация между некоторыми аллельными вариантами гена *GGP* и повышенным содержанием витамина С. Сравнение паттернов экспрессии гена *GGP* у образцов, характеризующихся высоким и низким содержанием витамина С, указывает на ключевую роль *GGP* в накоплении витамина С. На основе найденных SNP созданы молекулярные маркеры, которые могут быть использованы для получения новых сортов с повышенным содержанием витамина С в плодах яблок (Mellidou et al., 2012). Была показана также связь между *DHAR* и QTL, ассоциированным с устойчивостью к потемнению плодов (Mellidou et al., 2012).

Известно, что цитрусовые являются важным источником витамина С. Были изучены паттерны экспрессии 13 генов метаболизма витамина С (как синтеза, так и деградации и рециркуляции) в плодах двух видов апельсина (*Citrus sinensis*) и мандарина (*C. unshiu*). Для анализируемых цитрусовых основным путем синтеза витамина С оказался L-галактозный путь. При этом накопление АК максимально в кожуре и мякоти, что коррелирует с профилями экспрессии генов L-галактозного пути, в то время как мио-инозитоловый путь преобладает при синтезе АК в кожуре незрелых плодов. В качестве ключевых генов, контролирующих синтез АК в мякоти, предложены *GGP* и *GPP*. В кожуре помимо них важна также работа генов *GMP* и мио-инозитолоксигеназы *MIOX* (Alós et al., 2014). Относительная экспрессия генов рециркуляции *MDHAR* и *DHAR* коррелировала с накоплением АК по мере созревания плода, и сорта с повышенным содержанием АК характеризовались повышенной экспрессией данных генов (Alós et al., 2014).

Таким образом, на сегодняшний день нельзя однозначно сказать, что какой-то из четырех известных путей биосинтеза АК является преобладающим в плодах растений. Так, например, в плодах персика (Imai et al., 2009) и киви (Bulley et al., 2009) преобладающим является L-галактозный путь, тогда как в плодах винограда (Cruz-Rus et al., 2010) и клубники (Agius et al., 2003), по всей видимости, основным является D-галактуроновый путь. В то же время у ряда растений, например цитрусовых или томата, по мере созревания плодов происходит смена доминирующих путей (Badejo et al., 2012; Alós et al., 2014).

### Ключевые гены и ферменты, определяющие биосинтез и накопление L-аскорбиновой кислоты в ягодах, овощах и фруктах

#### Ферменты L-галактозного пути

**ГДФ-маннозофосфорилаза (GMP, VTC1) (EC 2.7.7.22)** обладает маннозо-1-фосфат-гуанилтрансферазной активностью. Впервые ген, кодирующий этот фермент, был детектирован и клонирован из мутантного растения арабидопсиса, характеризующегося пониженным содержанием аскорбиновой кислоты (Conklin et al., 1999). В дальнейшем было показано, что у томата ингибирование фермента GMP уменьшает содержание АК в плодах (Keller et al., 1999).

В базе данных NCBI представлены последовательности гена *VTC1* арабидопсиса (*A. thaliana*), томата (*S. lycopersicum*), репы (*Brassica rapa*), капусты огородной (*Brassica oleracea*), картофеля (*Solanum tuberosum*), папайи (*Carica papaya*), черешни (*P. avium*), риса (*Oryza sativa*), табака (*Nicotiana tabacum*), зизифуса (*Ziziphus jujuba*), перца (*Capsicum annuum*). Структура гена консервативна, он состоит из 4 экзонов, 4 интронов, общая протяженность гена около 2500 п. н.

**ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза (GME) (EC 5.1.3.18)** катализирует обратимую реакцию эпимеризации ГДФ-D-маннозы, которая является одной из основных на L-галактозном пути биосинтеза АК. В результате реакции происходит гидролиз высокоэнергетической гликозил-пирофосфорилазной связи. GME может катализировать две различные реакции с образованием из ГДФ-D-маннозы либо ГДФ-L-галактозы, либо ГДФ-L-гулозы. ГДФ-L-гулоза представляет собой начальный субстрат для альтернативного гулозного пути биосинтеза АК. Другой продукт реакции – ГДФ-L-галактоза, в дальнейшем может не только использоваться для синтеза витамина С, но и расходоваться на биосинтез клеточной стенки и гликопротеинов, что прежде всего необходимо для роста вегетативных органов (Lukowitz et al., 2001; Gilbert et al., 2009; Mounet-Gilbert et al., 2016). Работа данного фермента может оказывать влияние также на развитие пыльцы и семяобразование (Mounet-Gilbert et al., 2016).

На сегодняшний день GME считается одним из важнейших ферментов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях. Кодирующие его гены были выделены и охарактеризованы у арабидопсиса (Wolucka et al., 2001; Wolucka, Van Montagu, 2003), риса (Watanabe et al., 2006) и томата (Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011). При этом в геномах риса и томата выявлено по два паралогичных гена (Watanabe et al., 2006; Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011). Положительная корреляция экспрессии этого гена и содержания АК была показана для яблони (Li et al., 2010) и черники (Liu et al., 2015). Для киви (Bulley et al., 2009), персика (Imai et al., 2009) и томата (Ioannidi et al., 2009; Mellidou et al., 2012) такой закономерности не выявлено. Учитывая необходимость поддержания метаболического баланса между конкурирующими за общий субстрат (ГДФ-L-галактозу) процессами синтеза АК и клеточной стенки, авторы показали, что сверхэкспрессия гена *GME* не приводила к увеличению содержания АК у арабидопсиса (Yoshimura et al., 2014). В то же время совместная сверхэкспрессия генов *GME* и *GPP* вызывала гораздо большее увеличение накопления АК по сравнению со сверхэкспрессией одного только гена *GPP* (Bulley et al., 2009). Аналогичные данные получены и для плодов киви (Bulley et al., 2009). Это выявляет важнейшее значение генов *GME* и *GPP* и их роль в совместной регуляции L-галактозного пути.

У растений известно два паралогичных гена *GME1* и *GME2* протяженностью около 1500 п. н. Они имеют высокую степень гомологии, состоят из 6 экзонов и 5 интронов. Среди плодовоощных культур эти гены известны у винограда (*V. vinifera*), томата (*S. lycopersicum*), ананаса (*Ananas comosus*), дыни (*Cucumis melo*), шелковицы (*Morus notabilis*).

**ГДФ-Л-галактозофосфорилаза (GPP, VTC2/VTC5)** (ЕС 2.7.7.69) катализирует реакцию фосфорилирования ГДФ-Л-галактозы до Л-галактозо-1-фосфата. Впервые важная роль гена *VTC2* была показана у арабидопсиса (Dowdle et al., 2007). Рекомбинантные аллели *VTC2* арабидопсиса дикого типа и двух мутантов были экспрессированы в *Escherichia coli*. Продукт одной мутантной аллели не приводил к синтезу витамина С, продукт другой аллели обладал всего 2 % от активности *VTC2* гена дикого типа. Однако при детальном анализе растений установлено, что *vtc2*-мутанты арабидопсиса, тем не менее, накапливают АК в количестве 10–20 % от уровня ее содержания в растении дикого типа. Это позволило предположить существование иных путей синтеза АК (Dowdle et al., 2007; Laing et al., 2007; Linster et al., 2007, 2008).

Кроме того, были проведены эксперименты по изучению изменения уровня АК в ответ на сверхэкспрессию *VTC2* у арабидопсиса, томата, клубники, картофеля и риса (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014). В растениях, трансформированных конструкциями с геном *VTC2*, содержание АК значительно повышалось (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014).

По некоторым данным, на накопление АК в плодах оказывает влияние не только кодирующая последовательность гена *VTC2*, но также участок в промоторной области. Было показано, что синтез АК может контролироваться посттранскрипционной репрессией ГДФ-Л-галактозофосфорилазы. Регуляция происходит за счет наличия дополнительной рамки считывания (uORF). «Выключение» этой uORF приводит к синтезу ГДФ-Л-галактозофосфорилазы и, как следствие, увеличению концентрации АК. Такое посттрансляционное регулирование АК, вероятно, является достаточно древним механизмом контроля, поскольку uORF присутствует в генах *GPP* множества растений – от мхов до покрытосеменных (Laing et al., 2015).

Из вышеизложенного следует, что у ряда растений именно *GPP/VTC2* служит ключевым регулятором биосинтеза АК. С использованием этого гена выполнены многие биотехнологические работы, целью которых было увеличение содержания витамина С (Zhou et al., 2012).

На сегодняшний день в NCBI представлены последовательности нескольких паралогичных генов *GPP* у арабидопсиса (*A. thaliana*), репы (*B. rapa*), капусты (*B. oleracea*), кукурузы (*Zea mays*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*S. tuberosum*), табака (*N. attenuata*). Их протяженность составляет около 2740 п. н., а структура состоит из 7 экзонов и 6 интронов.

**Л-галактозо-1-фосфатфосфатаза (GPP/VTC4)** (ЕС 3.1.3.В9) осуществляет реакцию дефосфорилирования с образованием Л-галактозы. GPP считается также эффективным ферментом для регулирования синтеза АК. Это предположение было выдвинуто для киви (Laing et al., 2004; Bulley et al., 2009), яблока (Mellidou et al., 2012) и томата (Ioannidi et al., 2009). Однако следует отметить, что даже при покауте гена *GPP* АК синтезируется, хотя и в меньшем количестве, что указывает на присутствие в геноме других функциональных фосфатаз, участвующих в биосинтезе АК, или на наличие синтеза АК по иным путям (Conklin et al., 2006; Torabinejad et al., 2009).

GPP является бифункциональным ферментом, катализирующим биосинтез не только АК, но и мио-инозитола. Тем самым работа GPP может служить точкой соединения для Л-галактозного и мио-инозитолового путей биосинтеза АК (Torabinejad et al., 2009).

Для представителей царства растений известны гомологичные гены *GPP* у арабидопсиса (*A. thaliana*) с 12 экзонами и 11 интронами, протяженностью 2413 п. н. и у репы (*B. rapa*) с 9 экзонами и 9 интронами, протяженностью 7196 п. н.

**Л-галактозо-1-дегидрогеназа (GalDH)** (ЕС 1.1.1.316) и **Л-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (GalLDH)** (ЕС 1.3.2.3). GalDH окисляет Л-галактозу до Л-галактоно-1,4-лактона с использованием NAD<sup>+</sup> в качестве акцептора электронов. GalLDH – конечный фермент Л-галактозного пути, приводящий непосредственно к синтезу АК. В настоящее время ген *GalDH* выделен из арабидопсиса, гороха, киви, яблока (Gatzek et al., 2002; Laing et al., 2004; Mieda et al., 2004). В плодах груши выявлено, что большие концентрации АК в кожуре являются в том числе следствием высокой активности GalDH и следующего в биохимическом пути фермента GalLDH (Huang et al., 2013). Фермент GalLDH был охарактеризован у нескольких видов растений, включая сладкий картофель (Imai et al., 1998), цветную капусту (Oesterhelt et al., 1997), шпинат (Mutsuda et al., 1995), табак (Yabuta et al., 2000), клубнику (do Nascimento et al., 2005), дыню (Pateraki et al., 2004), томат (Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011) и арабидопсис (Leferink et al., 2008). До открытия *VTC2* считалось, что именно эти ферменты, осуществляющие конечные этапы биосинтеза АК, могут иметь ключевое значение, по крайней мере у томатов (Alhagdom et al., 2007; Mellidou et al., 2012). Однако недавно выдвинуто предположение, что GalDH может влиять на аккумуляцию АК за счет участия в транспорте АК между различными органами (Mellidou, Kanellis, 2017; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

Для гена *GalDH* известны гомологи в геномах кукурузы (*Z. mays*), черешни (*P. avium*), ячменя (*Hordeum vulgare*) и арабидопсиса (*A. thaliana*). Протяженность данного гена в среднем составляет 4300 п. н., а его структура представлена 5 экзонами и 4 интронами. Что же до гомологов гена *GalLDH*, то они аннотированы в геномах черешни (*P. avium*), сладкого перца (*C. annuum*) и яблони (*M. domestica*) и имеют протяженность в 5139, 7667 и 6329 п. н. соответственно. Ген состоит из 6 экзонов и 5 интронов.

#### Ферменты D-галактуронового пути

**NADPH-зависимая D-галактуронатредуктаза (GalUR)**. Субстратом для работы этого фермента является D-галактуронат – продукт распада пектинов клеточной стенки, в результате проводимой GalUR реакции образуется Л-галактонат (см. рисунок). В плодах винограда (*V. vinifera*) была показана взаимозависимость экспрессии *GalUR* с накоплением витамина С по мере созревания плодов (Cruz-Rus et al., 2010). Аналогичные данные приведены для плодов клубники (*Fragaria sp.*), у которой GalUR также играет ключевую роль в биосинтезе АК (Agius et al., 2003). Следует отметить, что реакции D-галактуронового пути в растениях недостаточно изучены и необходимы

дальнейшие биохимические, физиологические и генетические исследования. Гомологи гена *GalUR* были аннотированы в геномах подсолнечника (*H. annuus*) и табака (*N. attenuata*) с протяженностью в 2671 и 12453 п. н. соответственно. Оба гомолога состоят из 4 экзонов и 3 интронов.

#### Ферменты, участвующие в рециркуляции АК

**Дегидроаскорбатредуктаза (DHAR1) и монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR).** Ферментативная активность *MDHAR* тесно коррелирует с накоплением АК в томате при пониженной температуре, что говорит о значимой роли *MDHAR* в регуляции синтеза АК при стрессах.

Идентификация генов *MDHAR* и *DHAR* и дальнейший функциональный анализ показали, что сверхэкспрессия гена *DHAR* приводила к увеличению содержания АК в 1.6 раза в плодах томата, выращенных при относительно низкой освещенности. В исследовании уровней экспрессии двух изоформ *MDHAR* было показано, что увеличение транскрипции этого гена отрицательно коррелирует с повышением уровня АК во время созревания плодов томата (Li et al., 2013). Однако высказано предположение, что *MDHAR* является важной детерминантой изменения уровня АК в условиях стресса (Ioannidi et al., 2009). Так, при холодовом (Li et al., 2013) и окислительном стрессе (Gest et al., 2013) активность *MDHAR* значительно увеличивает уровень содержания АК в плодах.

Роль *MDHAR* в повышении содержания АК однозначно показана для томатов с помощью QTL-картирования (Sauvage et al., 2014), а также определения экспрессионных профилей и активности фермента в процессе созревания (Mellidou et al., 2012). Экспрессия данного гена коррелирует с накоплением витамина С в плодах черники (Liu et al., 2015). Супрессия *MDHAR* в плодах томата приводила к уменьшению содержания АК, из чего можно предположить, что контроль процесса рециркуляции посредством увеличения активности *MDHAR* может быть эффективным способом повышения содержания витамина С (Truffault et al., 2017). Более того, как показано с использованием siRNA, уменьшение активности данного фермента приводит к неспособности растений томата противостоять холодовому стрессу (El Airaj et al., 2013).

Экспрессия гена *DHAR* коррелировала с накоплением АК в плодах шиповника (Huang et al., 2014) и черники (Liu et al., 2015).

У растений известно три паралогичных гена *DHAR1*, *DHAR2* и *DHAR3*. Гены-паралоги имеют низкую степень гомологии. Ген *DHAR1* протяженностью около 6000 п. н. состоит из 6 экзонов и 5 интронов.

Среди плодовоовощных культур гены *DHAR* известны у винограда (*V. vinifera*), томата (*S. lycopersicum*), черешни (*P. avium*), перца (*C. annuum*), яблони (*M. domestica*).

Гены-паралоги *MDHAR* имеют низкую степень гомологии. Количество экзонов варьирует от 9 до 17. Известны у томата (*S. lycopersicum*), арабидопсиса (*A. thaliana*), перца (*C. annuum*).

Таким образом, работа ферментов рециркуляции АК требует дальнейшего изучения, что обусловлено их возможной непосредственной связью с устойчивостью к холодовому и окислительному стрессу.

#### Закключение

В статье рассмотрены основные пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты и пути ее рециркуляции в тканях растений. Выделены ключевые гены, участвующие в биосинтезе и накоплении АК в плодах. Вместе с тем огромный массив полученных в этом направлении данных показывает нам, что наиболее значимую роль (изменения) в биосинтезе, накоплении и рециркуляции АК играет синергетическое взаимодействие всех этих составляющих. Вполне возможно, что изучение именно этих взаимодействий определит направление для следующего десятилетия научных работ, посвященных изучению метаболизма витамина С в растениях.

#### Список литературы / References

- Стрельцина С.А., Бурмистров Л.А., Никитина Е.В. Питательные и биологически активные вещества плодов рябины (*Sorbus L.*) в условиях северо-западной зоны садоводства России. Аграр. Россия. 2010;3:10-17.
- [Streltsina S.A., Burmistrov L.A., Nikitina E.V. Nutritious and biologically active substances of mountain ash fruits (*Sorbus L.*) in the conditions of the northwestern zone of horticulture in Russia. Agrar-naya Rossiya = Agricultural Russia. 2010;3:10-17. (in Russian)]
- Agius F., Gonzalez-Lamothe R., Caballero J., Munoz-Blanco J., Botella M., Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *NatBiotechnol.* 2003;21:177-181. DOI 10.1038/nbt777.
- Akram N., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid – a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 2017;8:613. DOI 10.3389/fpls.2017.00613.
- Alhagdow M., Mounet F., Gilbert L., Nunes-Nesi A., Garcia V., Just D., Petit J., Beauvoit B., Fernie A.R., Rothan C., Baldet P. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol.* 2007;145:1408-1422. DOI 10.1104/pp.107.106500.
- Alós E., Rodrigo M.J., Zacarías L. Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta.* 2014;239:1113-1128. DOI 10.1007/s00425-014-2044-z.
- Badejo A.A., Wada K., Gao Y.S., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J. Exp. Bot.* 2012;63:229-239. DOI 10.1093/jxb/err275.
- Baydoun E.A.H., Fry S.C. [2-<sup>3</sup>H]Mannose incorporation in cultured plant cells: investigation of L-galactose residues of the primary cell wall. *J. Plant Physiol.* 1988;132:484-490. DOI 10.1016/S0176-1617(88)80068-3.
- Bulley S.M., Rassam M., Hoser D., Otto W., Schünemann N., Wright M., MacRae E., Gleave A., Laing W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 2009;60(3):765-778. DOI 10.1093/jxb/ern327.
- Bulley S., Wright M., Rommens C., Yan H., Rassam M., Lin-Wang K., Andre C., Brewster D., Karunairatnam S., Allan A.C., Laing W.A. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.* 2012;10:390-397. DOI 10.1111/j.1467-7652.2011.00668.x.
- Cholet C., Claverol S., Claisse O., Rabot A., Osowsky A., Dumot V., Ferrari G., Gény L. Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. *BMC Plant Biol.* 2016;16:144. DOI 10.1186/s12870-016-0833-1.



- Conklin P.L., Gatzek S., Wheeler G.L., Dowdle J., Raymond M.J., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J.A., Smirnov N. *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* 2006;281:15662-15670. DOI 10.1074/jbc.M601409200.
- Conklin P.L., Norris S.R., Wheeler G., Williams E.H., Smirnov N., Last R.L. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:4198-4203. DOI 10.1073/pnas.96.7.4198.
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sanchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Valpuesta V. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 2011;62:4191-4201. DOI 10.1093/jxb/err122.
- Cruz-Rus E., Botella M.A., Valpuesta V., Gomez-Jimenez M.C. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *J. Plant Physiol.* 2010;167:739-748. DOI 10.1016/j.jplph.2009.12.017.
- Davey M.W., Gilot C., Persiau G., Østergaard J., Han Y., Bauw G.C., Van Montagu M.C. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiol.* 1999;121:535-543. DOI 10.1104/pp.121.2.535.
- Davey M.W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnov N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80:825-860. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
- Di Matteo A., Sacco A., Anacleria M., Pezzotti M., Delledonne M., Ferrarini A., Frusciante L., Barone A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biol.* 2010;10:163. DOI 10.1186/1471-2229-10-163.
- Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 1998;80:77-112. DOI 10.1079/BJN19980106.
- do Nascimento J.R.O., Higuchi B.K., Gomez M.L.P.A., Oshiro R.A., Lajolo F.M. L-ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 2005;38:34-42. DOI 10.1016/j.postharvbio.2005.05.014.
- 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 viability. *Plant J.* 2007;52:673-689. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03266.x.
- El Airaj H., Gest N., Truffaut V., Garchery C., Riqueau G., Gouble B., Page D., Stevens R. Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biol. Technol.* 2013;86:502-510. DOI 10.1016/j.postharvbio.2013.07.035.
- Figuerola-Méndez R., Rivas-Arancibia S. Vitamin C in health and disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front. Physiol.* 2015;6:397. DOI 10.3389/fphys.2015.00397.
- Gatzek S., Wheeler G.L., Smirnov N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J.* 2002;30(5):541-553. DOI 10.1046/j.1365-313X.2002.01315.x.
- Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R. Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnol. J.* 2013;11:344-354. DOI 10.1111/pbi.12020.
- Gilbert L., Alhaghdow M., Nunes-Nesi A., Quemener B., Guillon F., Bouchet B., Faurobert M., Gouble B., Page D., Garcia V., Petit J., Stevens R., Causse M., Fernie A.R., Lahaye M., Rothan C., Baldet P. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J.* 2009;60:499-508. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.03972.x.
- Hancock R.D., Walker P.G., Pont S.D.A., Marquis N., Vivera S., Gordon S.L., Brennan R.M., Viola R. L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by *in situ* biosynthesis via the L-galactose pathway. *Funct. Plant Biol.* 2007;34:1080-1091. DOI 10.1071/FP07221.
- 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;171(14):1205-1216. DOI 10.1016/j.jplph.2014.03.010.
- Huang W., Qing G., Zhang H., Wu J., Zhang S. Distribution and metabolism of ascorbic acid in pear fruit (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Aikansui). *Afr. J. Biotechnol.* 2013;12:1952-1961. DOI 10.5897/AJB11.4048.
- Imai T., Ban Y., Terakami S., Yamamoto T., Moriguchi T. L-ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development. *Physiol. Plant.* 2009;136:139-149. DOI 10.1111/j.1399-3054.2009.01213.x.
- Imai T., Karita S., Shiratori G., Hattori M., Nunome T., Oba K., Hirai M. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol.* 1998;39:1350-1358. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029341.
- Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannonni J., Kanellis A.K. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.* 2009;60:663-678. DOI 10.1093/jxb/ern322.
- Iqbal Y., Ihsanullah I., Shaheen N., Hussain I. Significance of vitamin C in plants. *J. Chem. Soc. Pakistan.* 2009;31:169-170.
- Jain A.K., Nessler C.L. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol. Breed.* 2000;6(1):73-78. DOI 10.1023/A:1009680818138.
- Keller R., Springer F., Renz A., Kossmann J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J.* 1999;91:131-141. DOI 10.1046/j.1365-313X.1999.00507.x.
- Laing W.A., Frearson N., Bulley S., MacRae E. Kiwifruit L-galactose dehydrogenase: molecular, biochemical and physiological aspects of the enzyme. *Funct. Plant Biol.* 2004;31:1015-1025. DOI 10.1071/FP04090.
- Laing W.A., Martinez-Sanchez M., Wright M.A., Bulley S.M., Brewster D., Dare A.P., Rassam M., Wang D., Storey R., Macknight R.C., Hellens R.P. An upstream open reading frame is essential for feedback regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2015;27:772-786. DOI 10.1105/tpc.114.133777.
- Laing W.A., Wright M.A., Cooney J., Bulley S.M. The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:9534-9539. DOI 10.1073/pnas.0701625104.
- Leferink N.G., van den Berg W.A., van Berkel W.J. L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS J.* 2008;275:713-726. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x.
- Li J., Li M., Liang D., Cui M., Ma F. Expression patterns and promoter characteristics of the gene encoding *Actinidia deliciosa* L-galactose-1-phosphate phosphatase involved in the response to light and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 2013;40:1473-1485. DOI 10.1007/s11033-012-2190-y.
- Li M., Chen X., Wang P., Ma F. Ascorbic acid accumulation and expression of genes involved in its biosynthesis and recycling in developing apple fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2011;136:231-238.
- Li M., Ma F., Liang D., Li J., Wang Y. Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumula-

- tion in kiwi. *PLoS One*. 2010;5(12):e14281. DOI 10.1371/journal.pone.0014281.
- Li M.J., Ma F.W., Zhang M., Pu F. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Sci*. 2008;174:606-612. DOI 10.1016/j.plantsci.2008.03.008.
- Liang D., Zhu T., Ni Z., Lin L., Tang Y., Wang Z., Wang X., Wang J., Lv X., Xia H. Ascorbic acid metabolism during sweet cherry (*Prunus avium*) fruit development. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172818. DOI 10.1371/journal.pone.0172818.
- Linster C.L., Adler L.N., Webb K., Christensen K.C., Brenner C., Clarke S.G. A second GDP-L-galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C: covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *J. Biol. Chem*. 2008;283:18483-18492. DOI 10.1074/jbc.M802594200.
- Linster C.L., Gomez T.A., Christensen K.C., Adler L.N., Young B.D., Brenner C., Clarke S.G. *Arabidopsis VTC2* encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J. Biol. Chem*. 2007;282:18879-18885. DOI 10.1074/jbc.M702094200.
- Liu F., Wang L., Gu L., Zhao W., Su H., Cheng X. Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry. *Food Chem*. 2015;188:399-405. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.05.036.
- Loewus F.A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*. 1999;52:193-210. DOI 10.1016/S0031-9422(99)00145-4.
- Loewus F.A., Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Arch. Biochem. Biophys*. 1961;95:483-493. DOI 10.1016/0003-9861(61)90180-1.
- Loewus F.A., Loewus M.W. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Crit. Rev. Plant Sci*. 1987;5:101-119. DOI 10.1080/07352688709382235.
- Lorence A., Chevone B.I., Mendes P., Nessler C.L. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol*. 2004;134:1200-1205. DOI 10.1104/pp.103.033936.
- Lukowitz W., Nickle T.C., Meinke D.W., Last R.L., Conklin P.L., Somerville C.R. *Arabidopsis cyt1* mutants are deficient in a manose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98(5):2262-2267. DOI 10.1073/pnas.051625798.
- Maruta T., Ichikawa Y., Mieda T., Takeda T., Tamoi M., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. The contribution of *Arabidopsis* homologs of L-gulonol-1,4-lactone oxidase to the biosynthesis of ascorbic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2010;74:1494-1497. DOI 10.1271/bbb.100157.
- Mellidou I., Chagné D., Laing W., Keulemans J., Davey M.W. Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiol*. 2012;160:1613-1629. DOI 10.1104/pp.112.203786.
- Mellidou I., Kanellis A.K. Genetic control of ascorbic acid biosynthesis and recycling in horticultural crops. *Front. Chem*. 2017;5:50. DOI 10.3389/fchem.2017.00050.
- Michell R.H. Evolution of the diverse biological roles of inositols. *Biochem. Soc. Symp*. 2007;74:223-246. DOI 10.1042/BSS0740223.
- Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol*. 2004;45:1271-1279. DOI 10.1093/pcp/pch152.
- Mounet-Gilbert L., Dumont M., Ferrand C., Bournonville C., Monier A., Jorly J., Lemaire-Chamley M., Mori K., Atienza I., Herould M., Stevens R., Lehner A., Mollet J.C., Rothan C., Lerouge P., Baldet P. Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J. Exp. Bot*. 2016;67:4767-4777. DOI 10.1093/jxb/erw260.
- Mutsuda M., Ishikawa T., Takeda T., Shigeoka S. Subcellular-localization and properties of L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1995;59:1983-1984. DOI 10.1271/bbb.59.1983.
- Nishikimi M., Yagi K. Biochemistry and Molecular Biology of Ascorbic Acid Biosynthesis. In: Harris J.R. (Ed.). *Subcellular Biochemistry (Ascorbic Acid: Biochemistry and Biochemical Cell Biology)*. Springer, Boston, MA, 1996;25:17-39. DOI 10.1007/978-1-4613-0325-1\_2.
- Oesterhelt C., Schnarrenberger C., Gross W. The reaction mechanism of phosphomannomutase in plants. *FEBS Lett*. 1997;401:35-37. DOI 10.1016/S0014-5793(96)01425-1.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*. 2003;15:939-951. DOI 10.1105/tpc.010538.
- Pateraki I., Sanmartin M., Kalamaki M.S., Gerasopoulos B., Kanelis A.K. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J. Exp. Bot*. 2004;55:1623-1633. DOI 10.1093/jxb/erh186.
- Radzio J.A., Lorence A., Chevone B.I., Nessler C.L. L-Gulonol-1,4-lactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis* (*vtc*) mutants. *Plant Mol. Biol*. 2003;53(6):837-844. DOI 10.1023/B:PLAN.0000023671.99451.1d.
- Roberts R.M. The metabolism of D-mannose-<sup>14</sup>C to polysaccharide in corn roots. Specific labelling of L-galactose, D-mannose, and L-fucose. *Arch. Biochem. Biophys*. 1971;145:685-692. DOI 10.1016/S0003-9861(71)80029-2.
- Rodríguez-Ruiz M., Mateos R.M., Codesido V., Corpas F.J., Palma J.M. Characterization of the galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biol*. 2017;12:171-181. DOI 10.1016/j.redox.2017.02.009.
- Sauvage C., Segura V., Bauchet G., Stevens R., Do P.T., Nikoloski Z., Fernie A.R., Causse M. Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant Physiol*. 2014;165:1120-1132. DOI 10.1104/pp.114.241521.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S. The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in *Euglena gracilis* z. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 1979;25:299-307. DOI 10.3177/jnsv.25.299.
- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic. Biol. Med*. 2018;122:116-129. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Suekawa M., Kondo T., Fujikawa Y., Esaka M. Regulation of Ascorbic Acid Biosynthesis in Plants. In: Hossain M.A. et al. (Eds.). *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer, 2017;157-176. DOI 10.1007/978-3-319-74057-7\_6.
- Torabinejad J., Donahue J.L., Gunesekera B.N., Allen-Daniels M.J., Gillaspay G.E. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiol*. 2009;150:951-961. DOI 10.1104/pp.108.135129.
- Truffault V., Fry S.C., Stevens R.G., Gautier H. Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *Plant J*. 2017;89(5):996-1008. DOI 10.1111/tpj.13439.
- Walker P.G., Viola R., Woodhead M., Jorgensen L., Gordon S., Brennan R., Hancock R. Ascorbic acid content of blackcurrant fruit is influenced by both genetic and environmental factors. *Func. Plant Sci. Biotech*. 2010;1:40-52.
- Wang L.Y., Meng X., Yang D.Y., Wang G.D., Meng Q.W. Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress. *Plant Cell Rep*. 2014;33(9):1441e1451. DOI 10.1007/s00299-014-1627-2.
- Watanabe K., Suzuki K., Kitamura S. Characterization of a GDP-D-mannose 3",5"-epimerase from rice. *Phytochemistry*. 2006;67:338-346. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.12.003.

- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:365-369. DOI 10.1038/30728.
- Wolucka B.A., Persiau G., Van Doorselaere J., Davey M.W., Demol H., Vandekerckhove J., Van Montagu M., Zabeau M., Boerjan W. Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98:14843-14848. DOI 10.1073/pnas.011578198.
- Wolucka B.A., Van Montagu M. GDP-mannose 3,5-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem.* 2003;278:47483-47490. DOI 10.1074/jbc.M309135200.
- Xu Q., Chen L., Ruan X., ... Nagarajan N., Deng X., Ruan Y. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet.* 2013;45:59-66. DOI 10.1038/ng.2472.
- Yabuta Y., Yoshimura K., Takeda T., Shigeoka S. Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 2000;41:666-675. DOI 10.1093/pcp/41.6.666.
- Yang X.Y., Xie J.X., Wang F.F., Zhong J., Liu Y.Z., Li G.H., Peng S.A. Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp. *J. Plant Physiol.* 2011;168:2196-2205. DOI 10.1016/j.jplph.2011.07.015.
- Yoshimura K., Nakane T., Kume S., Shiomi Y., Maruta T., Ishikawa T., Shigeoka S. Transient expression analysis revealed the importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014;78:60-66. DOI 10.1080/09168451.2014.877831.
- Zhang C.J., Liu J.X., Zhang Y.Y., Cai X.F., Gong P.J., Zhang J.H., Wang T.T., Li H.X., Ye Z.B. Overexpression of *SIGMEs* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep.* 2011;30:389-398. DOI 10.1007/s00299-010-0939-0.
- Zhang Y.Y., Li H.X., Shu W.B., Zhang C.J., Zhang W., Ye Z.B. Suppressed expression of ascorbate oxidase gene promotes ascorbic acid accumulation in tomato fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2011;29:638-645. DOI 10.1007/s11105-010-0271-4.
- Zhou Y., Tao Q.C., Wang Z.N., Fan R., Li Y., Sun X.F., Tang K.X. Engineering ascorbic acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis* leaves by single and double gene transformation. *Biol. Plant.* 2012;56:451-457. DOI 10.1007/s10535-012-0119-x.

---

**ORCID ID**

E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-316-00033 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.09.2018. После доработки 24.11.2018. Принята к публикации 25.11.2018.