

УДК 581.1.577.21:575.113.12

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ МОНОДЕГИДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗ
(MDHAR) ЧЕСНОКА (*Allium sativum* L.) И ИХ УЧАСТИЕ В ОТВЕТЕ
НА ЗАРАЖЕНИЕ *Fusarium proliferatum*© 2022 г. О. К. Анисимова¹, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹, М. А. Филюшин¹, *¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 22.12.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2022 г.

Монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) восстанавливают образующуюся в результате нейтрализации активных форм кислорода монодегидроаскорбиновую кислоту до аскорбиновой кислоты, что является одним из основных механизмов поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса. В геноме чеснока (*Allium sativum* L.) идентифицированы последовательно три гена MDHAR, кодирующих монодегидроаскорбатредуктазы различной клеточной локализации. В аминокислотных последовательностях AsMDHAR1, AsMDHAR4 и AsMDHAR5 были идентифицированы домен Prg_gedox_2, домены связывания с кофакторами FAD и NAD(P)H и мотив уникальной длинной петли, необходимый для формирования активного сайта фермента. Определены профили экспрессии генов MDHAR1, MDHAR4 и MDHAR5 в различных органах растения чеснока, а также исследовано изменение уровней транскрипции генов AsMDHARs в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*. Показано, что максимальные уровни транскрипции генов AsMDHARs характерны для листьев, ложного стебля и в случае AsMDHAR1 – корней. В ответ на заражение *F. proliferatum* выявлено увеличение транскрипции всех трех генов AsMDHAR в корнях растений чеснока, при этом активация генов была сходной и не зависела от степени устойчивости сорта к фузариозной гнили.

Ключевые слова: чеснок, *Allium sativum*, рециклинг аскорбиновой кислоты, монодегидроаскорбатредуктаза, *Fusarium proliferatum*.

DOI: 10.31857/S0016675822070037

Образующиеся в процессе метаболизма в клетках растений активные формы кислорода (АФК) вызывают окисление компонентов клеточных мембран и деградацию нуклеиновых кислот, белков и пигментов, что в конечном итоге может приводить к гибели клеток [1]. Важным компонентом антиоксидантной системы растений является L-аскорбиновая кислота (АК, аскорбат, витамин С), которая нивелирует действие некоторых АФК, напрямую связываясь с ними [2, 3]. Также АК является субстратом для аскорбатпероксидаз (APX; EC 1.11.1.11) и аскорбатоксидаз (АО; EC 1.10.3.3), ключевых ферментов окислительно-восстановительной системы растений [3, 4].

В результате реакций нейтрализации АФК и деятельности ферментов APX и АО образуется окисленная форма АК – монодегидроаскорбиновая кислота (МДНА), которая затем может самопроизвольно диспропорционировать с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (ДНА) и молекулы аскорбата [3]. Образующиеся окисленные

формы АК (МДНА и ДНА) способны восстанавливаться до аскорбата специфичными ферментами – монодегидроаскорбатредуктазой (MDHAR; EC 1.6.5.4) и дегидроаскорбатредуктазой (DHAR; EC 1.8.5.1) соответственно [3].

Монодегидроаскорбатредуктазы в клетках растений локализируются в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и цитозоле [5, 6]. К настоящему времени гены MDHAR идентифицированы у многих видов растений [5–10]. Показано существенное изменение уровней транскрипции генов MDHAR и активности кодируемых ферментов в ответ на различные абиотические стрессы [1, 5, 9–12]. Так, сверхэкспрессия MDHAR повышает устойчивость к солевому стрессу у растений табака [13] и риса [14]. У лука репчатого *Allium cepa* в ответ на солевой стресс выявлено увеличение активности MDHAR в симпласте корня и листа [15]. Исследований изменения экспрессии/активности MDHAR в ответ на биотические стрессы крайне мало. Например, у пшеницы *Triticum aestivum*

tivum в ответ на заражение различными расами грибного патогена *Puccinia striiformis* выявлено увеличение транскрипции гена *TaMDHAR4* через 48 ч после заражения, при этом замалчивание гена *TaMDHAR4* повышает устойчивость пшеницы к *P. striiformis* [9]. В зерне кукурузы *Zea mays* после инокуляции грибами *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans* и *Aspergillus flavus* наблюдается значительное снижение активности MDHAR [10]. Для некоторых видов растений была изучена роль MDHAR в росте и развитии растений, а также в регуляции накопления сахаров и аскорбата в плодах и листьях. Например, у томата снижение активности MDHAR подавляет рост растений, а также снижает содержание сахарозы в плодах и урожайность [16], однако специфичное отсутствие экспрессии MDHAR только в плодах томата на продуктивность не влияет [17]. Сверхэкспрессия MDHAR значительно снижает содержание АК в спелых плодах томата [18]. У лука-порея *Allium porrum* были определены профили экспрессии трех генов MDHAR, выявлена положительная корреляция транскрипции гена *MDHAR4* с содержанием АК в белой части и зеленых листьях растений [19]. Таким образом, на различных видах растений показаны участие MDHAR в определении стрессоустойчивости, а также взаимосвязь активности MDHAR и содержания АК.

Чеснок (*Allium sativum* L.) является экономически значимой мировой овощной культурой с ежегодным производством более 50 млн т (из них более 200 тыс. т в РФ) (FAO 2019; <http://www.fao.org>). В процессе роста и хранения чеснок подвержен воздействию различных абиотических и биотических стрессов. Значительные потери урожая чеснока связаны с грибными патогенами, наиболее вредоносными из которых являются грибы рода *Fusarium* Link, вызывающие гниль луковиц и/или увядание листьев чеснока [20–23]. Гены метаболизма АК у чеснока к настоящему времени не охарактеризованы, их участие в ответе на стрессы ранее не исследовалось. В настоящей работе были проведены идентификация и характеристика генов монодегидроаскорбатредуктаз в геноме чеснока *A. sativum*, определен профиль их экспрессии в различных органах растения, в том числе в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов MDHARs. Поиск последовательностей генов монодегидроаскорбатредуктаз проводили в геноме и транскриптоме чеснока *A. sativum* cv. Ershuizao, доступных в базе данных NCBI (PRJNA606385, сборка Garlic.V2.fa; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [24]. В качестве референса использовали последовательности мРНК трех генов MDHAR спаржи

Asparagus officinalis (*AoMDHAR1* (XP_020260315.1), *AoMDHAR4* (XP_020251572.1), *AoMDHAR5* (XP_020241046.1)).

Выравнивание и анализ последовательностей MDHARs проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Консервативные домены и мотивы белков MDHARs определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) в сопоставлении с литературными данными. Молекулярный вес, изоэлектрическую точку (pI) и значение индекса гидропатичности (GRAVY) рассчитывали с помощью ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>). Прогнозирование образования дисульфидных связей выполняли с помощью сервиса DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>). Для поиска трансмембранных спиралей использовали сервис ТМНММ server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/>), для поиска доменов связывания с кофакторами – Cofactory-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0>), для поиска транспортных и сигнальных пептидов – TargetP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Внутриклеточную локализацию белков MDHARs предсказывали с помощью WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>).

Растительный материал. В работе были использованы растения чеснока сортов Сармат и Стрелец. Луковицы сортов Сармат и Стрелец были предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Московская обл.).

Растения чеснока сорта Сармат были выращены в 2021 г. в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м²/с)). Через 90 дней различные органы (корни, донце, луковича, листья, цветонос, цветоложе и воздушные луковичи) растений были собраны и использованы для анализа тканеспецифичной экспрессии генов MDHARs.

Зубки чеснока сортов Сармат и Стрелец были использованы для исследования изменения уровня транскрипции генов MDHARs в ответ на инфицирование патогеном *F. proliferatum*. По данным полевых наблюдений ФНЦО (2015–2020 гг.) сорт Сармат устойчив к фузариозной гнили, а сорт Стрелец – восприимчив (в отдельные годы наблюдается гибель 70–90% растений). По 12 зубков каждого сорта чеснока стерилизовали в 70%-ном этаноле (3 мин), промывали стерильной дистиллированной водой, помещали на чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и инкубировали при 25°C в темноте. Через 72 ч, когда наблюдался активный рост корней, половину зубков каждого сорта заражали грибом *F. proliferatum* изоллят Стрелец [23] путем вымачивания в суспензии

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения РВ-ПЦР

Ген	Последовательности праймеров (5'–3')
<i>MDHAR1</i>	TTTGAACCCCTGGCGAGCTTG CTGGCAGTAAGCGTTCTCCA
<i>MDHAR4</i>	CGCAGGTTATGCAGCTCTTG CGCCTACGCAAGTATGAAATGC
<i>MDHAR5</i>	GGGGCTCGCATAGATAAGTTGA TCCCACGGACTTATTTCAGCC
<i>GAPDH</i>	CCATGTTTGTGTTGTTGGTGTGAATGAG TGGTGCAGCTAGCGTTGGAGAC
<i>UBQ</i>	AAGCCAAGATACAGGACAAG GCATACCACCTCTCAATCTC

конидий ($\sim 10^6$ конидий/мл) в течение 5 мин. После этого зубки помещали на чашки Петри и инкубировали при 25°C в темноте. Оставшиеся зубки использовали в качестве контроля: вымачивали в дистиллированной воде в течение 5 мин, помещали на чашки Петри и далее инкубировали при 25°C в темноте. Через 24 и 96 ч после заражения визуально оценивали состояние зараженных и контрольных зубков чеснока и отбирали корни (по два биологических повтора для каждого сорта) для анализа экспрессии генов *MDHARs*.

Выделение РНК, синтез кДНК. Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и использовали для выделения РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set; QIAGEN, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США).

Определение профиля экспрессии генов *MDHARs*. Профиль экспрессии генов *MDHARs* определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов *MDHARs* были разработаны специфичные праймеры (табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *MDHAR* оценивали, используя референсные гены *GAPDH* [25] и *UBQ* [26]. Для РВ-ПЦР использовали набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для визуализации данных и статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и анализ последовательностей *MDHARs* чеснока

В результате проведенного поиска в геноме чеснока *Allium sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385) [24] были идентифицированы три последовательности, гомологичные генам *AoMDHAR1*, *AoMDHAR4* и *AoMDHAR5* спаржи *As. officinalis* (табл. 2). Найденные гены были обозначены как *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5*. В версии 01 генома чеснока (сборка ASM1415589v1) ген *AsMDHAR1* локализован на хромосоме 5, ген *AsMDHAR4* – на хромосоме 8, ген *AsMDHAR5* – на хромосоме 6. Однако в версии 02 генома чеснока (сборка Garlic.V2.fa) ген *AsMDHAR1* локализован на хромосоме 7, а хромосомная локализация генов *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* не выяснена (табл. 2), что можно объяснить тем, что взаимосвязь между хромосомами версии 01 (ASM1415589v1) и версии 02 (Garlic.V2.fa) окончательно не определена.

Проведенный структурный анализ полногеномных последовательностей *AsMDHARs* позволил определить размеры и экзон-интронную структуру генов (табл. 2). Экзон-интронная структура полностью соответствовала структуре гомологов *AsMDHARs* у спаржи *As. officinalis* (*AoMDHAR1*, *AoMDHAR4* и *AoMDHAR5*) и *Arabidopsis thaliana* (*AtMDHAR1*, *AtMDHAR4* и *AtMDHAR6*).

Аминокислотные последовательности, кодируемые идентифицированными генами монодегидроаскорбатредуктаз чеснока, были высоко гомологичны последовательностям *MDHARs* *As. officinalis* (сходство 83% (*MDHAR5*), 84% (*MDHAR4*) и 86% (*MDHAR1*)). Сходство последовательностей *AsMDHARs* и *AtMDHARs* составило 70–72%.

С помощью ресурса NCBI-CDD в аминокислотных последовательностях *AsMDHARs* был идентифицирован консервативный домен Puf_redox_2 (pfam07992) (рис. 1). Домен Puf_redox_2 специфичен для семейства пиридиннуклеотиддисульфидоксидоредуктаз (PNDR) и содержит

Таблица 2. Характеристики генов *AsMDHARs* и кодируемых ими монодегидроаскорбатредуктаз *Allium sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385)

Ген	Ген ID [19]	Локализация в геноме	Длина гена, пн	Число экзонов	Размер кДНК, пн	Белок, ао	MW, кДа	pI
<i>AsMDHAR1</i>	Asa7G02482.1	chr5:1670600630–1670609439*; chr7:671746557–671755367**	8810	10	1308	435	47.1	5.81
<i>AsMDHAR4</i>	Asa0G05211.1	chr8:228808527–228829319*; scaffold6471:143589–164381**	20793	7	1425	474	52.1	9.03
<i>AsMDHAR5</i>	Asa5G00445.1	chr6:153009626–153033684*; —	24059	17	1458	485	52.9	6.54

* Сборка ASM1415589v1.

** Сборка Garlic.V2.fa.

консервативные мотивы связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H [11]. С помощью программы Cofactory-1.0 данные мотивы были идентифицированы в белках *AsMDHARs* (рис. 1). Было показано, что *AsMDHAR1* и *AsMDHAR4* имеют в своем составе по два мотива (в положениях 5–47 и 163–203 ао (*AsMDHAR1*), 4–47 и 161–200 ао (*AsMDHAR4*)), а *AsMDHAR5* – три мотива (48–89, 204–243 и 272–310 ао). Характерный для FAD/NAD(P)H-связывающих доменов консенсус GxGxxG [27] был выявлен в обоих FAD/NAD(P)H-связывающих мотивах белков *AsMDHAR1* и *AsMDHAR4* и в первых двух мотивах белков *AsMDHAR5* (рис. 1). Также у всех трех *AsMDHARs* была обнаружена последовательность уникальной длинной петли (unique long loop; *AsMDHAR1* – RLPGFHVCVGSGGERLLP, *AsMDHAR4* – RLPAFHNTCVGANEDRLTP, *AsMDHAR5* – RLPGFHNTCVGSGGERQTP), необходимой для формирования активного сайта фермента [11, 28].

Важную роль в определении функций и поддержании пространственной структуры белка, а также устойчивости к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов играют дисульфидные связи, формируемые остатками цистеина [11, 29]. Образование дисульфидной связи защищает молекулу фермента от окислительного повреждения, что продемонстрировано на примере глутатионтрансферазы *A. thaliana* [30]. Нами было обнаружено, что последовательность белка *AsMDHAR1* содержит три остатка цистеина в положениях 70, 179 и 199, при этом два из них, Cys179 и Cys199, согласно предсказанию сервиса DiANNA 1.1, могут формировать дисульфидную связь Cys179–Cys199 (YIGLECAAALK–YPERWCMPLRF). Для шести остатков цистеина *AsMDHAR4* (положения 34, 68, 142, 160, 177 и 197) самая высокая вероятность (score 0.99) образования дисульфидной связи была предсказана для Cys68–Cys160 (PAFHNTCVGANE–DVMKSCNGGNA), Cys68–Cys197 (PAFHNTCVGANE–FPEAHNC-

MARLF) и Cys142–Cys197 (DAENVCYLRNL–FPEAHNCMARLF). В последовательности *AsMDHAR5* было выявлено пять остатков цистеина в положениях 34, 79, 115, 170 и 368, из которых дисульфидную связь могут образовывать Cys34–Cys170 (MQRVPCRRSFV–IVSTGCESARL) и Cys79–Cys115 (ADGKLCIVTKE–PGFHNTCVGSGG). Предсказанные дисульфидные мостики у *AsMDHARs* могут оказывать стабилизирующее влияние на структуру данных белков в процессе их функционирования в окислительно-восстановительной системе растения чеснока.

Внутриклеточная локализация ферментов связана с той функцией, которую выполняет конкретный компартмент клетки. Растения могут генерировать большое количество АФК через хлоропластные, пероксисомные или митохондриальные пути [31]. При этом ответственными за улавливание АФК посредством ферментативных процессов являются, прежде всего, цитоплазма и хлоропласты [32]. Мы использовали программу WoLF PSORT для предсказания возможной внутриклеточной локализации белков *AsMDHAR*. Было показано, что активность анализируемых ферментов может быть ассоциирована с АФК-связанными процессами в цитоплазме и органеллах: *AsMDHAR1* – в цитоплазме, *AsMDHAR5* – в митохондриях и хлоропластах, а *AsMDHAR4* – в пероксисомах. Дополнительным свидетельством локализации *AsMDHAR4* явилось присутствие на его С-конце мотива WYGRRRRRW (рис. 1), характерного для пероксисомных монодегидроаскорбатредуктаз [11]. Наличие трансмембранной спирали (VYNWHAAGIAVSVSIAAFAYWY) в положении 445–467 ао, предсказанное с помощью TMHMM server 2.0, определило *AsMDHAR4* как интегральный мембранный белок. Подтверждением локализации *AsMDHAR5* в митохондриях и хлоропластах стал предсказанный с помощью TargetP-2.0 N-концевой митохондриальный транспортный пептид (1–39 ао).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей AsMDHARs и их гомологов у *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* и *Aporagus officinalis* показал четкое разделение на три группы, соответствующие предполагаемой внутриклеточной локализации белков (рис. 2,а). В проводимых ранее исследованиях также наблюдалось разделение MDHARs высших растений на три группы [6, 33]. В этой связи интересно, что все три изоформы фермента, обнаруженные у мха *Physcomitrella patens*, PpMDHAR1, PpMDHAR2 и PpMDHAR3, напоминали исключительно цитозольную форму монодегидроаскорбатредуктазы, сохранившуюся у всех наземных растений [33]. Это может свидетельствовать о цитозольной форме MDHAR как основной, в результате эволюции которой возникли сначала пероксисомная, а затем хлоропластная/митохондриальная изоформы фермента (рис. 2,а).

В дополнение к результатам филогенетического анализа была проведена сравнительная характеристика консервативных мотивов (MEME 5.1.1) в последовательностях белков MDHARs *A. sativum*, *A. cepa*, *As. officinalis* и *A. thaliana*. Всего был идентифицирован 21 консервативный мотив, 12 из которых были общими для всех трех изоформ фермента (рис. 2,б). Цитозольные и пероксисомные MDHARs отличались только консенсусом коротких N-концевых мотивов 18 и 21 и присутствием у пероксисомной формы C-концевого мотива 11 (рис. 2,б), который включал консенсус WYGRRRRRW, специфичный для данного типа монодегидроаскорбатредуктаз [11]. Цитозольные MDHARs (кроме AoMDHAR1) выделялись также наличием мотива 20 (NNPESP) (рис. 2,б). Хлоропластные/митохондриальные MDHARs отличались от остальных изоформ присутствием C-концевого мотива 15, мотива 19, а также N-концевого мотива 13, соответствующего транспортному митохондриальному пептиду, предсказанному в последовательности AsMDHAR5 и AoMDHAR5 (рис. 2,б). Таким образом, пероксисомная изоформа могла произойти в результате дупликации и модификации гена цитозольной изоформы, сопровождающейся изменением N-области и увеличением размера кодирующей последовательности на C-конце, что предполагает участие данных консенсусов в обеспечении пероксисомной локализации белка. Дальнейшие модификации N- и C-концевых участков (мотивы 13, 15, 19), по всей вероятности, способствовали возникновению хлоропластной/митохондриальной изоформы MDHAR.

Профиль экспрессии генов AsMDHARs в различных органах растения чеснока

Транскриптомные данные *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA607255, GSE145455) [24] были использованы для *in silico* оценки уровней экспрес-

сии генов AsMDHARs в различных тканях растения чеснока (рис. 3). Наибольшая транскрипция гена AsMDHAR1 была обнаружена в корнях, листьях, ложном стебле и на некоторых стадиях развития луковицы. Максимальная экспрессия гена AsMDHAR4 наблюдалась в зеленых фотосинтезирующих тканях – листьях, ложном стебле и проростках. Высокие уровни транскрипции AsMDHAR5 выявлены в процессе формирования луковицы (стадии 1–5), листьях, бутонах и проростках.

Методом РВ-ПЦР был определен профиль экспрессии генов AsMDHAR1, AsMDHAR4 и AsMDHAR5 в корне, луковице, донце, псевдостебле, листе, цветоносе, цветоложе и воздушной луковице растения чеснока сорта Сармат (рис. 4,а). В целом было показано, что уровень транскрипции AsMDHAR1 значительно превышает экспрессию двух других генов. К примеру, экспрессия в корнях AsMDHAR1 была выше таковой AsMDHAR5 и AsMDHAR4 почти в 6 и 60 раз соответственно (рис. 4,а). Транскрипты всех трех генов были выявлены во всех анализируемых тканях. Уровни транскрипции AsMDHAR1 в корнях, ложном стебле и листьях были сопоставимо высокими. В донце, цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах уровень экспрессии AsMDHAR1 был одинаков и минимален. Максимальный уровень экспрессии гена AsMDHAR4 наблюдался в листьях, а минимальный – в корнях и донце. В луковице и воздушных луковицах уровни транскрипции AsMDHAR4 были сходными. Максимальные уровни экспрессии гена AsMDHAR5 выявлены в ложном стебле и листьях, тогда как в корнях, цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах уровни транскрипции гена были в 2 раза ниже (рис. 4,а). Полученные результаты в целом согласуются с данными экспрессионного *in silico* анализа *A. sativum* cv. Ershuizao (рис. 3) – максимальные уровни транскрипции генов AsMDHARs характерны для листьев, ложного стебля и, в случае AsMDHAR1 – корней (рис. 4,а).

С целью определить, участвуют ли гены AsMDHARs в ответе на стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскрипции генов AsMDHARs в корнях чеснока в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum* (рис. 4,б) через 24 и 96 ч после заражения зубков сортов Сармат (устойчив к фузариозной гнили) и Стрелец (восприимчив к фузариозной гнили). Признаки фузариозной гнили (развитие белого пушистого мицелия на корнях и неровных светло-коричневых пятен на зубках) появились через 96 ч после заражения только у растений восприимчивого сорта Стрелец.

В целом у анализируемых образцов чеснока, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, наблюдалась сходная динамика экспрессии генов AsMDHARs в ответ на заражение *F. proliferatum*. В результате анализа у обоих сортов чес-

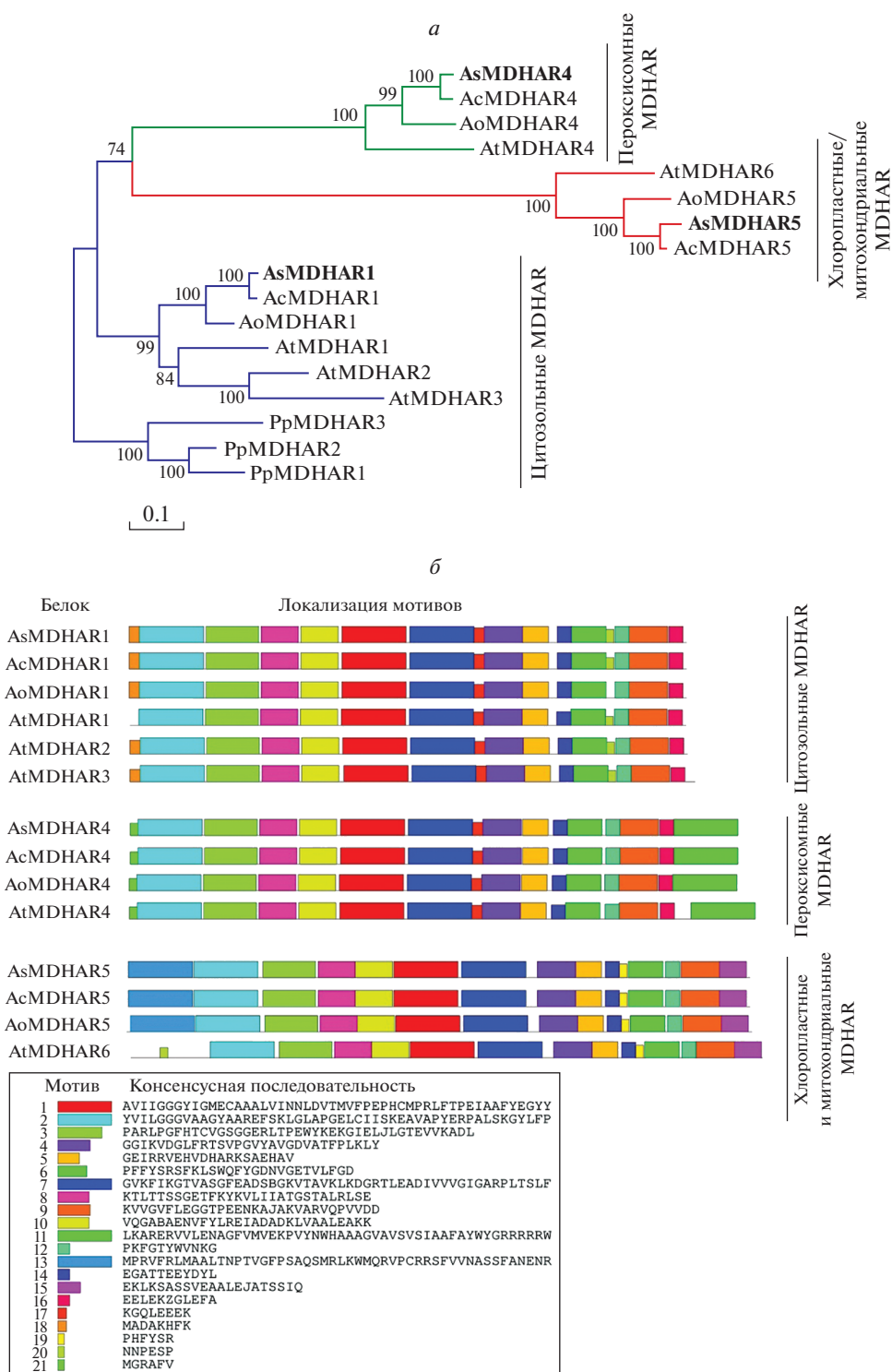


Рис. 2. *a* – филогенетическое дерево на основе последовательностей белков MDHARs чеснока *A. sativum* (AsMDHARs, полужирным шрифтом), лука репчатого *A. cepa* (AcMDHAR1 (GEOY01092914.1), AcMDHAR4 (GFAK01049639.1), AcMDHAR5 (GFAK01071117.1)), спаржи *As. officinalis* (AoMDHAR1 (XP_020260315.1), AoMDHAR4 (XP_020251572.1), AoMDHAR5 (XP_020241046.1)), *A. thaliana* (AtMDHAR1 (At3g52880, NP_190856), AtMDHAR2 (At5g03630, NP_568125.1), AtMDHAR3 (At3g09940, NP_566361.1), AtMDHAR4 (At3g27820, NP_189420.1), AtMDHAR6 (At1g63940, NP_849839.1)) и *P. patens* (PpMDHAR1 (ABA47446.1), PpMDHAR2 (ABA47447.1) и PpMDHAR3 (ABA47448.1)). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood, 1000 бутстреп-реplik). Предсказание локализации белков сделано с помощью программы WoLF PSORT, а также UniProtKB (для AtMDHARs); *b* – идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках MDHARs *A. sativum* (As), *A. cepa* (Ac), *As. officinalis* (Ao) и *A. thaliana* (At).

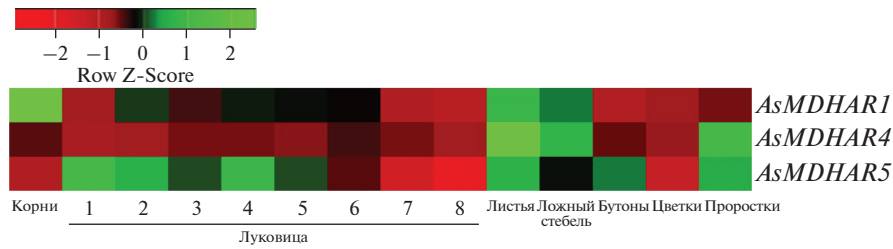


Рис. 3. Тепловая карта экспрессии генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* у *A. sativum* cv. Ershuizao в корнях, луковичах (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответствуют 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дням развития луковичи), листьях, ложном стебле, бутонах, цветках и проростках. Цвета от красного к зеленому показывают градиент экспрессии гена от низкого к высокому.

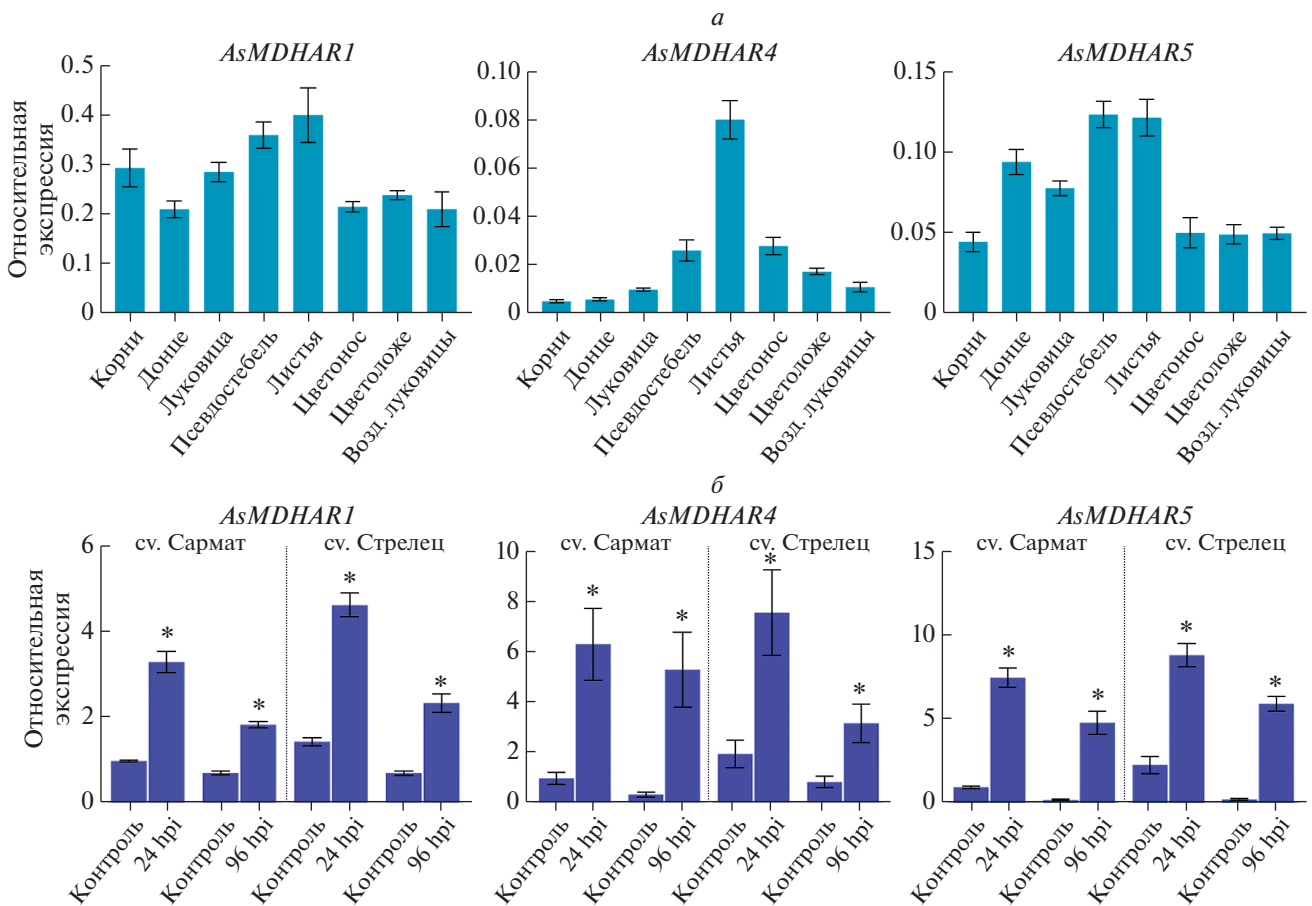


Рис. 4. *a* – профиль экспрессии генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* в различных органах чеснока (сорт Сармат); *б* – изменение уровней транскрипции генов *AsMDHARs* в корнях чеснока сортов Сармат (устойчивый) и Стрелец (восприимчивый) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum*. Данные нормализовали по уровням транскрипции генов *GAPDH* и *UBQ* и представляли как кратное изменение (среднее \pm стандартная ошибка) от контроля (24 ч) сорта Сармат, принятого за 1; * $p < 0.01$ по сравнению с неинфицированным контролем. hpi – часов после заражения.

нока была выявлена значительная активация транскрипции всех трех генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* в ответ на заражение *F. proliferatum*, при этом пик увеличения экспрессии приходился на 24 ч после заражения (рис. 4,б). В случае незараженного контроля, в точке (24 ч)

уровни транскрипции генов *AsMDHARs* были в 1.4–2.3 раза выше у восприимчивого сорта Стрелец, чем у устойчивого сорта Сармат; в точке (96 ч) уровни экспрессии генов *AsMDHARs* у обоих сортов чеснока снизились в 1.3–2.7 раза по сравнению с точкой (24 ч) (рис. 4,б).

Известно, что при воздействии различных абиотических и биотических стрессов в тканях растений увеличивается производство АФК, вызывающих неконтролируемое окисление компонентов клеток [2, 34, 35]. Антиоксидантная система растений, важным компонентом которой является АК и аскорбат-зависимые ферменты, предотвращает накопление АФК и минимизирует негативные последствия их перепроизводства [1, 36].

Ранее сообщалось об увеличении активности *MDHAR* у растений в ответ на различные абиотические стрессы, такие как засоление, повышенная освещенность, УФ-излучение, низкая температура, засуха, тяжелые металлы, гормоны и др. [12, 35, 37]. Исследования реакции генов *MDHAR* или активности кодируемых ими ферментов на биотические стрессы ограничиваются несколькими работами. У кукурузы *Z. mays* в ответ на заражение грибами *F. proliferatum*, *F. subglutinans* и *A. flavus* наблюдалось значительное снижение ферментативной активности *MDHAR* в зерне [10]. В листьях томата *S. lycopersicum*, начиная со второго дня грибной инфекции *Botrytis cinerea*, снижались антиоксидантные свойства митохондрий за счет снижения активности *MDHAR* [38]. В ответ на заражение тлей в листьях кукурузы было выявлено повышение транскрипции генов *MDHAR* [39].

С учетом вышесказанного можно предположить, что активация транскрипции генов *AsMDHARs* в корнях чеснока в ответ на заражение *F. proliferatum* связана с необходимостью восстановления образующихся при нейтрализации АФК окисленных форм АК для поддержания окислительно-восстановительного баланса. На это также указывает повышенная (в сравнении с другими тканями растения) экспрессия генов *MDHAR* в листьях и корнях растений — органах, первыми получающих стрессовые сигналы от окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 21-76-00007) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405–410.
- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // *Free Radical Biology and Medicine.* 2018. V. 22. P. 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
- De Tullio M.C., Guether M., Balestrini R. Ascorbate oxidase is the potential conductor of a symphony of signaling pathways // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. Article e23213. <https://doi.org/10.4161/psb.23213>
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. et al. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2111–2123. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066225>
- Sano S., Tao S., Endo Y. et al. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. V. 69. P. 762–772.
- Chew O., Whelan J., Millar A.H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46869–46877.
- Zhou F., Zheng B., Wang F. et al. Genome-wide analysis of *MDHAR* gene family in four cotton species provides insights into fiber development via regulating AsA redox homeostasis // *Plants (Basel)*. 2021. V. 10(2). Article 227. <https://doi.org/10.3390/plants10020227>
- Feng H., Liu W., Zhang Q. et al. TaMDHAR4, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 76. P. 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.015>
- Lanubile A., Maschietto V., De Leonardis S. et al. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015. V. 28(5). P. 546–557. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0269-R>
- Negi B., Salvi P., Bhatt D. et al. Molecular cloning, in-silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana* // *PLoS One.* 2017. V. 12. Article e0187793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187793>
- Zhang Y., Li Z., Peng Y. et al. Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments // *Molecules.* 2015. V. 20. P. 20939–20954. <https://doi.org/10.3390/molecules201119741>
- Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L. et al. Overexpression of *SIMDHAR* in transgenic tobacco increased salt stress tolerance involving S-nitrosylation regulation // *Plant Sci.* 2020. V. 299. Article 110609. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110609>
- Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M. et al. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.004>
- García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P. et al. The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress // *Antioxi-*

- dants (Basel). 2020. V. 12. Article 67.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010067>
16. Truffault V., Gest N., Garchery C. et al. Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light // *Plant Cell Environ.* 2016. V. 39. P. 1279–1292.
<https://doi.org/10.1111/pce.12663>
 17. Truffault V., Riqueau G., Garchery C. et al. Is monodehydroascorbate reductase activity in leaf tissue critical for the maintenance of yield in tomato? // *J. Plant Physiol.* 2018. V. 222. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.12.012>
 18. Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S. et al. Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato // *Plant Physiol. Biochem.* 2011. V. 49. P. 1244–1249.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.003>
 19. Филюшин М.А., Анисимова О.К., Кочиева Е.З., Шченникова А.В. Корреляция содержания аскорбиновой кислоты и профиля экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHARs) у лука-поррея (*Allium porrum* L.) // *Физиол. растений.* 2021. Т. 68(5). С. 501–508.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321050031>
 20. Gálvez L., Urbaniak M., Waśkiewicz A. et al. *Fusarium proliferatum* – causal agent of garlic bulb rot in Spain: genetic variability and mycotoxin production // *Food Microbiology.* 2017. V. 67. P. 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.05.006>
 21. Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Fusarium proliferatum* // *Plants.* 2021. V. 10. Article 720.
<https://doi.org/10.3390/plants10040720>
 22. Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Pathogenesis-related genes of PR1, PR2, PR4 and PR5 families are involved in the response to *Fusarium* infection in garlic (*Allium sativum* L.) // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Article 6688.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136688>
 23. Anisimova O.K., Seredin T.M., Danilova O.A., Filyushin M. First report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in Russian Federation // *Plant Dis.* 2021.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2743-PDN>
 24. Sun X., Zhu S., Li N. et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 1328–1339.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.019>
 25. Liu M., Wu Z., Jiang F. Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435–444.
<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0780-9>
 26. Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F. et al. The onion (*Allium cepa* L.) R2R3-MYB gene *MYB1* regulates anthocyanin biosynthesis // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. Article 1865.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01865>
 27. Yoon H.S., Lee H., Lee I.A. et al. Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1658. P. 181–186.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.05.013>
 28. Park A.K., Kim I.S., Do H. et al. Structure and catalytic mechanism of monodehydroascorbate reductase, MDHAR, from *Oryza sativa* L. japonica // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article 33903.
<https://doi.org/10.1038/srep33903>
 29. Ferrè F., Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 182–185.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl189>
 30. Tossounian M.A., Van Molle I., Wahni K. et al. Disulfide bond formation protects *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase tau 23 from oxidative damage // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018. V. 1862. P. 775–789.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.007>
 31. Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idänheimo N. et al. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signaling // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 3831–3844.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw080>
 32. Fan W.J., Feng Y.X., Li Y.H. et al. Unraveling genes promoting ROS metabolism in subcellular organelles of *Oryza sativa* in response to trivalent and hexavalent chromium // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 744. Article 140951.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140951>
 33. Lunde C., Baumann U., Shirley N.J. et al. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAR) genes in *Physcomitrella patens*: implications for the evolution of the MDHAR family in plants // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 60. P. 259–275.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
 34. García-Limones C., Hervás A., Navas-Cortés J.A. et al. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2002. V. 61. P. 325–337.
 35. Pandey P., Singh J., Achary V.M.M., Reddy M.K. Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway // *Front. Environ. Sci.* 2015. V. 3. Article 25.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00025>
 36. Anjum N.A., Gill S.S., Gill R. et al. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 1265–1283.
<https://doi.org/10.1007/s00709-014-0636-x>
 37. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. P. 845–856.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x>
 38. Kuzniak E., Skłodowska M. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 605–612.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh076>
 39. Sytykiewicz H. Expression patterns of genes involved in ascorbate-glutathione cycle in aphid-infested maize (*Zea mays* L.) seedlings // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. Article 268.
<https://doi.org/10.3390/ijms17030268>

Identification of Monodehydroascorbate Reductase Genes (MDHAR) in Garlic (*Allium sativum* L.) and Their Role in the Response to *Fusarium proliferatum* Infection

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

^aFederal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

Monodehydroascorbate (MDHA) reductase catalyzes the reduction of monodehydroascorbic acid, formed as a result of reactive oxygen species neutralization to ascorbic acid, which is one of the main mechanisms for maintaining the intracellular redox status. In the garlic genome (*Allium sativum* L.) three *MDHAR* genes encoding monodehydroascorbate reductases of different cellular localization were identified. In the amino acid sequences AsMDHAR1, AsMDHAR4, and AsMDHAR5, the Pyr_redox_2 domain, FAD and NAD(P)H cofactors binding domains and a unique long loop motif required for the enzyme active site formation were identified. The expression profiles of *MDHAR1*, *MDHAR4*, and *MDHAR5* genes in various organs of garlic plant were determined, and the alteration in the transcription levels of *AsMDHARs* in response to infection with the pathogen *Fusarium proliferatum* was studied. The maximum transcription levels of *AsMDHARs* was shown in leaves, pseudostem, and, in the case of *AsMDHAR1*, in roots. In response to *F. proliferatum* infection, in the roots of garlic plants an increase in the transcription levels of all three *AsMDHAR* genes was revealed, and expression patterns of the genes were similar and did not depend on the cultivar level of resistance to *Fusarium* rot.

Keywords: garlic, *Allium sativum*, ascorbic acid recycling, monodehydroascorbate, *Fusarium proliferatum*.