

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА И РЕЦИКЛИНГА АСКОРБАТА ВОВЛЕЧЕНЫ В ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ЧЕСНОКА *ALLIUM SATIVUM* L. НА ЗАРАЖЕНИЕ *FUSARIUM PROLIFERATUM*

© 2025 г. А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филюшин*

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 23.09.2024 г.

После доработки 28.09.2024 г.

Принято к публикации 28.09.2024 г

Определен профиль экспрессии ключевых генов биосинтеза (*VTC2*, *GPP*, *GalDH*, *GalLDH*) и рециклинга (*MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*) аскорбата в ответ на заражение грибным патогеном *Fusarium proliferatum* в корнях сортов чеснока, устойчивого (Поднебесный) и чувствительного (Дубковский) к фузариозной гнили. Обнаружено, что различия сортов в устойчивости к фузариозу сопровождаются расхождениями в динамике и уровне экспрессии отдельных генов аскорбатного пути, а также содержания аскорбата. Показано, что в ответ на инфекцию уровень экспрессии гена *MDHAR4* повышается у устойчивого сорта и снижается у чувствительного к фузариозу образца. По мере заражения уровни экспрессии генов *VTC2* и *GalLDH* существенно возрастают (у сорта Дубковский выше, чем у сорта Поднебесный). У обоих сортов повышается содержание аскорбата (у сорта Дубковский в 1.5 раза выше, чем у сорта Поднебесный).

Ключевые слова: чеснок, *Allium sativum*, метаболизм аскорбата, биотический стресс, грибной патоген *Fusarium proliferatum*

DOI: 10.31857/S2686738925010191, **EDN:** tbircu

L-Аскорбиновая кислота (аскорбат, витамин С, АК) является важным компонентом антиоксидантной защиты растения, благодаря способности нейтрализовать активные формы кислорода (АФК) [1, 2]. Растения синтезируют АК посредством преимущественно L-галактозного пути Смирнова-Уиллера, ключевыми ферментами которого являются GDP-L-галактозофосфорилаза (*VTC2*), L-галактозо-1-фосфатфосфатаза (*GPP*), L-галактозодегидрогеназа (*GalDH*) и L-галактоно-1,4-лактон дегидрогеназа (*GalLDH*) [1]. Первые стадии синтеза проходят в цитозоле, тогда как последняя стадия (*GalLDH*), определяющая конверсию L-галактоно-1,4-лактона (*GalL*) в АК, локализована на внутренней мембране митохондрий [1].

В ответ на изменения окружающей среды (как абиотические, так и биотические) растения генерируют АФК, что является одной из самых быстрых защитных реакций [2, 3]. АК совместно с глутатионом

(аскорбат-глутатионовый цикл AsA-GSH) являются одними из ключевых неферментативных антиоксидантов, снижение количества которых делает растения гиперчувствительными к стрессовым факторам [3, 4]. При взаимодействии с АФК АК под действием аскорбатпероксидаз и аскорбатоксидаз окисляется до L-монодегидроаскорбата (MDHA) и L-дегидроаскорбата (DHA), которые в процессе рециклинга могут быть восстановлены до АК с помощью монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR или MDAR) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR) соответственно [1, 3].

Активность ферментов АК-пути и количество АК изменяются в ответ на воздействие как абиотических, так и биотических стрессоров [3, 4]. Различные стрессовые состояния вызывают увеличение выработки АФК, что приводит к окислительному повреждению липидов, белков и ДНК [3]. Однако при биотическом стрессе АФК действуют как сигнальные молекулы, активирующие белки, связанные с патогенезом. Кроме того, образование большого количества АФК в клетках, прилегающих к очагу инфекции, вызывает гиперчувствительную реакцию, что останавливает распространение патогена на соседние ткани [3, 5].

Федеральное государственное учреждение
“Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук”, Москва, Россия
*e-mail: michel7753@mail.ru

Интересно, что дефицит аскорбата в растениях с мутацией *vtc-1* способствует росту их устойчивости к бактериальным и грибным патогенам [6]. В согласии с этим подавление экспрессии гена рециклинга АК *TaMDAR6* повышает устойчивость пшеницы к грибному патогену *Puccinia striiformis*; предположительно, это происходит из-за увеличения количества АФК и, как следствие, активации других механизмов устойчивости [7]. При этом увеличение экспрессии гена *VTC2* приводит к повышению содержания АК, что положительно влияет на устойчивость растений к абиотическим стрессорам [8, 9], однако может негативно сказаться на устойчивости к патогенам, исходя из [6].

Объект настоящего исследования – важная овощная культура чеснок (*Allium sativum* L.), который подвергается воздействию различных стрессоров, включая грибные патогены рода *Fusarium* [10]. Ранее нашей группой идентифицированы гены семейства *MDHAR* чеснока и показано, что в ответ на заражение *F. proliferatum* уровень экспрессии всех трех генов возрастает, независимо от устойчивости или чувствительности образцов чеснока [10]. Настоящая работа была сфокусирована на определении профиля коэкспрессии шести ключевых генов метаболизма АК, включая основные стадии биосинтеза (*VTC2*, *GPP*, *GaldDH*, *GalLDH*) и рециклинга (*MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*) АК в ответ на биотический стрессор – инфекцию грибным патогеном *F. proliferatum* в корнях чеснока двух сортов, устойчивого (Поднебесный) и чувствительного (Дубковский) к фузариозной гнили.

Для этого пророщенные зубки чеснока этих двух образцов, предоставленные Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Московская обл., Россия), заражали грибом *F. proliferatum* (изолят Стрелец) по описанной ранее схеме [10]. Спустя 24 и 96 ч после инфицирования визуально оценивали состояние зараженных и неинфицированных (контроль) зубков и анализировали экспрессию генов АК-пути в корнях (два биологических повтора). Спустя 24 ч зубки обоих сортов не имели признаков заболевания, тогда как через 96 ч зубки чувствительного сорта Дубковский характеризовались развитием грибного мицелия на корнях, что подтвердило различие между сортами в чувствительности к фузариозной гнили.

Из корней опытных и контрольных образцов в точках 24 и 96 ч была собрана корневая ткань, на основе которой были получены препараты суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия) и кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Экспрессия генов АК-пути была определена методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием разработанных праймеров для *VTC2*, *GPP*, *GaldDH*

и *GalLDH* (см. подпись к рис. 1) и набора “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО “Синтол”, Россия); праймеры к генам *MDHAR* были взяты из предшествующего исследования [10]. Реакцию (95°C 5 мин., 40 циклов (95°C 15 с, 62°C 50 с)) проводили в двух биологических и трех технических повторах с нормализацией на референсные гены *GAPDH* и *UBQ* [10] и статистической обработкой в GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

Проведенный анализ показал, что уровень транскриптов всех четырех генов биосинтеза АК (*VTC2*, *GPP*, *GaldDH*, *GalLDH*) повышается (*vs* контроль) в точках 24 и 96 ч у обоих сортов, кроме *GaldDH* в точке 24 ч у неустойчивого сорта Дубковский, где уровень транскриптов гена резко снизился до следовых значений (рис. 1а, б). Наиболее резкий рост (*vs* контроль) экспрессии был зарегистрирован для гена *GalLDH*, продукт которого катализирует финальную стадию биосинтеза АК (рис. 1б). В точке 96 ч уровень экспрессии всех четырех генов стал еще выше (рис. 1б). Основное различие между сортами определялось значительно более высокой экспрессией генов *VTC2* и *GalLDH* и также профилем экспрессии *GaldDH* у неустойчивого сорта Дубковский в сравнении с сортом Поднебесный (рис. 1б).

Гены рециклинга АК (*MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*) почти повторяли паттерн ответа на заражение, показанный нами ранее для двух других сортов чеснока – Сармат (устойчив к фузариозной гнили) и Стрелец (восприимчив к фузариозной гнили) [10]. А именно, спустя 24 ч уровень их транскриптов повысился в ответ на инфицирование у обоих сортов в ~3–4, 6–7 и 7–8 раз соответственно (рис. 1а, б). В точке 96 ч экспрессия генов существенно поднялась (*MDHAR5*) или снизилась (*MDHAR1*, *MDHAR4*), за исключением *MDHAR4* устойчивого сорта Поднебесный, где она выросла более чем в 2 раза (рис. 1а, б). Таким образом, экспрессия гена *MDHAR4* может отражать различия в ответе на заражение между образцами чеснока и участвовать в защите растений от фузариоза.

То, что у сорта Поднебесный устойчивость сопровождается ростом экспрессии гена *MDHAR4*, предполагает положительную зависимость между этими параметрами в отличие от ранее предложенной отрицательной связи [7]. Наши данные косвенно подтверждаются тем, что в листьях томата, инфицированных грибным патогеном *Botrytis cinerea*, снижается активность *MDHAR* и, как следствие, антиоксидантные свойства митохондрий [11].

Известно, что в фотосинтезирующих органах увеличение экспрессии гена *VTC2* приводит к повышению содержания АК [8]. Это позволило предположить, что ответ на заражение сопровождался накоплением АК в корнях образцов обоих сортов.

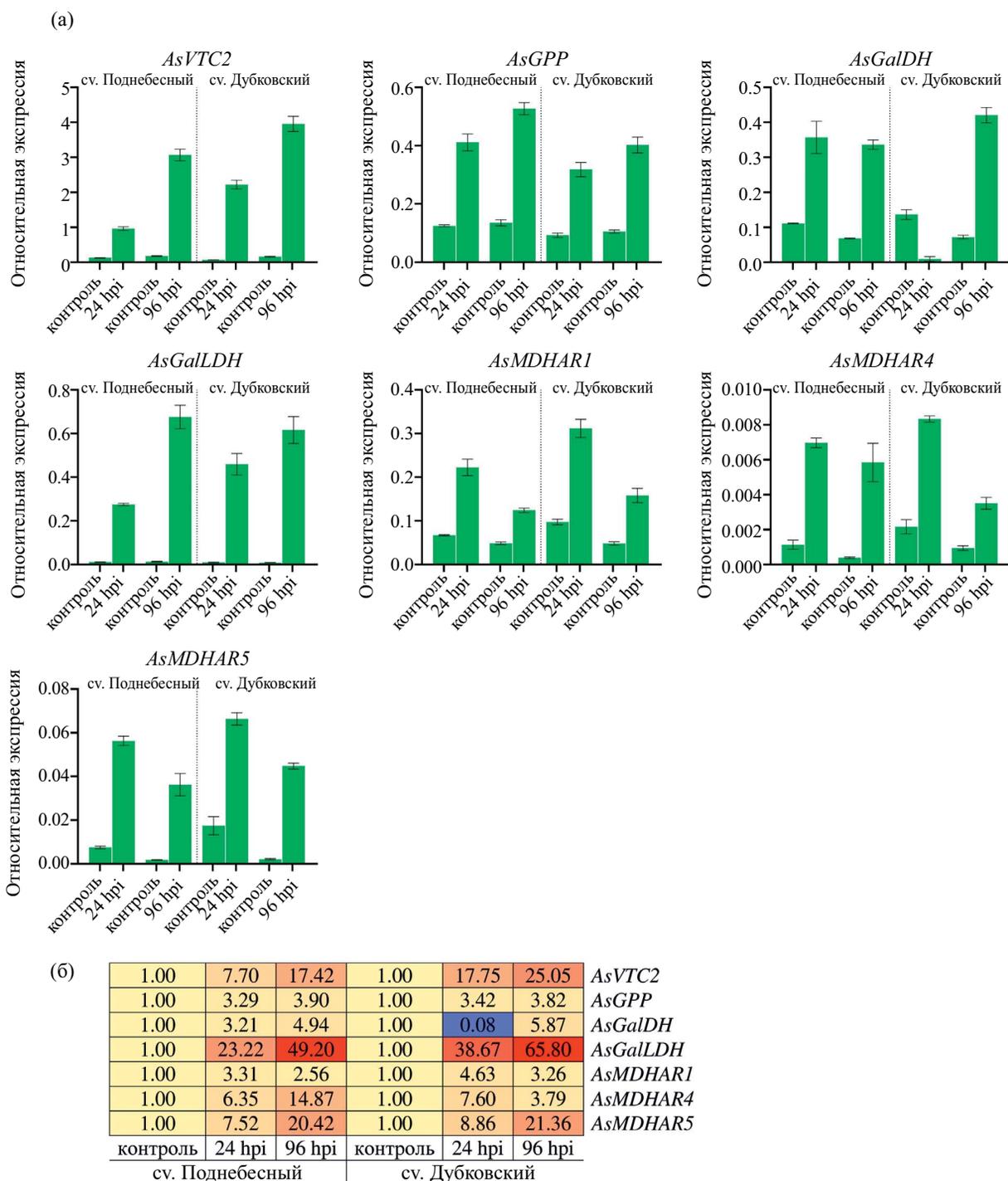


Рис. 1. а – Изменение уровней экспрессии генов биосинтеза и рециклинга аскорбата в корнях чеснока сортов Поднебесный и Дубковский через 24 и 96 ч после заражения патогенным грибом *Fusarium proliferatum*. Праймеры: *AsVTC2* (5'-ggtgtcaagcgtgtgtatctg-3'; 5'-ttccsaacacagcgggattgac-3'), *AsGPP* (5'-ggtcacagaactgataaagcatg-3'; 5'-catcagtaagtagagcagtgcc-3'), *AsGalDH* (5'-cctctgcccgaagcctttt-3'; 5'-ctaccacactgttggaacac-3'), *AsGalLDH* (5'-tggactgctaggagcaagagt-3'; 5'-gccttgcttaggcctgca-3'), *AsMDHAR1* (5'-ttgaacctggcgagcttg-3'; 5'-ctggcagtaagcgttctcca-3'), *AsMDHAR4* (5'-cgcaggttatcagctcttg-3'; 5'-cgcctacgcaagatgaaatgc-3'), *AsMDHAR5* (5'-ggggctcgcatagataagttga-3'; 5'-tccsacgacttattcagcc-3'). б – Данные экспрессии генов (А), нормализованные на контроль. Значения уровня экспрессии в контроле в каждой точке (24 и 96 ч) приняты за 1; значения уровня экспрессии в опытных (инфицированных) образцах пересчитаны пропорционально контролю. Цветовая гамма от синей к красной соответствует динамике экспрессии гена от понижения к повышению (vs контроль). hpi – часы после инфицирования

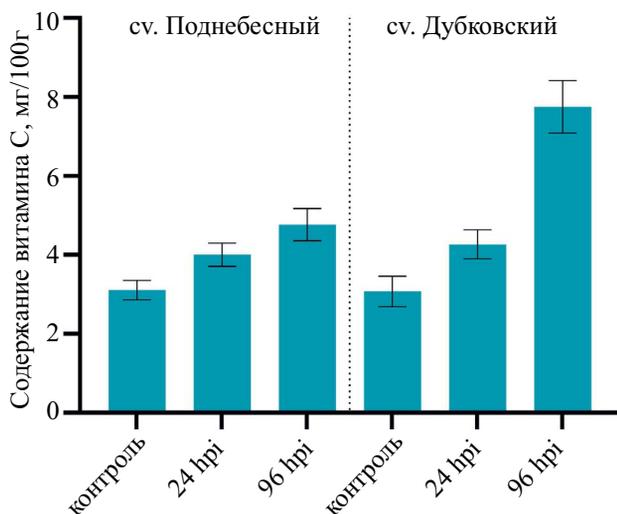


Рис. 2. Изменение содержания АК в корнях чеснока сортов Поднебесный и Дубковский через 24 и 96 ч после заражения патогенным грибом *Fusarium proliferatum*. hpi – часы после инфицирования

При этом более высокая экспрессия *VTC2* и *GalLDH* у сорта Дубковский (vs Поднебесный) подразумевает и большее накопление аскорбата в корнях данного образца. Это могло негативно сказаться на устойчивости к *Fusarium* сорта Дубковский, согласно предположениям в работе [6]. В то же время в нефотосинтезирующих тканях показана обратная зависимость между уровнем экспрессии *VTC2* и количеством АК [12]. В таком случае полученные нами результаты (рис. 1) могут указывать на меньшее содержание АК в корнях сорта Дубковский в сравнении с сортом Поднебесный и, следовательно, на положительную связь между количеством АК и устойчивостью чеснока к фузариозной гнили.

Для уточнения выдвинутых нами предположений в пробах корней образцов чеснока, использованных для анализа экспрессии генов, было определено содержание аскорбиновой кислоты (с помощью набора “Enzytec™ L-Ascorbic acid”, R-Biopharm AG, Германия) в двух биологических и трех технических повторах. В результате было подтверждено, что содержание АК растет по мере заражения (24 и 96 ч) в корнях обоих сортов. При этом в точке 24 ч количество АК сходно между сортами, тогда как в точке 96 ч в ~1.5 раза выше у неустойчивого сорта Дубковский (vs Поднебесный) (рис. 2). Это согласуется с более высокой экспрессией генов *VTC2* и *GalLDH* у сорта Дубковский (vs Поднебесный) (рис. 1а, б) и подтверждает наше предположение о негативном влиянии повышенного накопления аскорбата на устойчивость к *Fusarium* сорта Дубковский.

Таким образом, впервые было определено изменение экспрессии ключевых генов биосинтеза

(*VTC2*, *GPP*, *GalDH*, *GalLDH*) и рециклинга (*MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*) АК, а также содержания аскорбата в ответ на грибную инфекцию (*F. proliferatum*) в корнях устойчивого (Поднебесный) и чувствительного (Дубковский) к фузариозной гнили сортов чеснока. Было показано, что различия сортов в устойчивости к фузариозу сопровождаются различиями в динамике и уровне экспрессии отдельных генов АК-пути. На основании полученных результатов было предположено, что уровень экспрессии генов *VTC2* и *GalLDH* может иметь отрицательную корреляцию с устойчивостью чеснока к фузариозу, тогда как уровень экспрессии гена *MDHAR4* может быть положительно связан с устойчивостью чеснока к фузариозу.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-76-10005, экспрессионный анализ) и Министерства образования и науки РФ (подбор и подготовка растительного материала).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smirnoff N. // Free Radical Biology and Medicine. 2018. V. 22. P. 116–129.
2. Gill S.S., Tuteja N. // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909.
3. Apel K, Hirt H. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 373–399.
4. Kuźniak E., Kopczeński T., Chojak-Koźniowska J. // In: Hossain, M., et al. (eds) Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance. Springer. 2017.
5. Zurbriggen M.D., Carrillo N., Hajirezaei M.R. // Plant Signal Behav. 2010. V. 5(4). P. 393–396.
6. Barth C., Moeder W., Klessig D.F., et al. // Plant Physiol. 2004. V. 134(4). P. 1784–1792.
7. Abou-Attia M.A., Wang X., Nashaat Al-Attala M., et al. // Physiol. Plant. 2016. V. 156(3). P. 262–277.
8. Broad R.C., Bonneau J.P., Hellens R.P., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. 1790.

9. Ali B., Pantha S., Acharya R., et al. // J. Plant Physiol. 2019. V. 240. 152998.
10. Anisimova O. K., Shchennikova A. V., Kochieva E. Z., et al. // Russian Journal of Genetics. 2022. V. 58(7). P. 773–782.
11. Kuzniak E., Skłodowska M. // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 605–612.
12. Anisimova O. K., Seredin T. M., Shchennikova A. V., et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. P. 85–93.

ASCORBATE BIOSYNTHESIS AND RECYCLING GENES ARE INVOLVED IN THE RESPONSES OF GARLIC *ALLIUM SATIVUM* L. PLANTS TO *FUSARIUM PROLIFERATUM* INFECTION

A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, M. A. Filyushin*

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

*Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

*e-mail: michel7753@mail.ru

The expression profile of key genes of ascorbate biosynthesis (*VTC2*, *GPP*, *GalDH*, *GalLDH*) and recycling (*MDHAR1*, *MDHAR4*, *MDHAR5*) was determined in response to infection with the fungal pathogen *Fusarium proliferatum* in garlic cultivars related (Podnebesny) and sensitive (Dubkovsky) to *Fusarium* rot. It was found that differences in resistance to *Fusarium* lead to discrepancies in the dynamics and expression of individual genes of the ascorbate pathway, as well as in ascorbate content. It was shown that in response to infection, the expression level of the *MDHAR4* gene increases in the resistant cultivar and decreases in the *Fusarium*-sensitive accession. As infection progresses, the expression levels of the *VTC2* and *GalLDH* genes increase significantly (higher in the cv. Dubkovsky than in the cv. Podnebesny). In both cultivars, the ascorbate content increases (1.5 times higher in the cv. Dubkovsky than in the cv. Podnebesny).

Keywords: garlic, *Allium sativum*, ascorbate metabolism, biotic stress, fungal pathogen *Fusarium proliferatum*