

УДК 581.1.577.21:575.113.12

Идентификация генов халконсинтаз чеснока (*Allium sativum* L.) и уровень их экспрессии в ответ на стрессовые факторы

О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филюшин*

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

*E-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2025

Принята к печати 13.03.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27639

РЕФЕРАТ Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением флавоноидов, путь биосинтеза которых в растениях чеснока *Allium sativum* L. не охарактеризован. В данной работе в геноме *A. sativum* идентифицированы восемь генов халконсинтаз *AsCHS1–8*, предположительно катализирующих первую стадию синтеза флавоноидов в растениях чеснока. Установлено, что эти гены локализованы на четырех хромосомах. Гены *AsCHS2*, 6–8 содержат 1–2 интрона, тогда как *AsCHS1*, 3–5 безинтронные. Анализ органо-специфичных профилей экспрессии генов выявил значимый уровень транскриптов только *AsCHS3* и 8. И только для *AsCHS8* показано изменение уровня экспрессии при воздействии абиотических стрессоров (засоление, засуха, холод) и экзогенных фитогормонов (абсцизовая кислота, метилжасмонат). Полученные результаты позволяют предположить, что два гена из восьми – *AsCHS3* и 8 могут определять синтез флавоноидов повсеместно в процессе развития растения чеснока; из них *AsCHS8* экспрессируется существенно выше и участвует в ответе растения на стрессовые факторы. Остальные шесть генов (*AsCHS1*, 2, 4–7) могут участвовать в биосинтезе флавоноидов в узкоспециализированных клетках/тканях/органах или на отдельных стадиях развития растения чеснока. Проведенные нами идентификация и характеристика генов *AsCHS1–8* халконсинтаз чеснока может стать основой для дальнейшего анализа механизмов регуляции стрессовой адаптации *A. sativum*, а также других видов *Allium*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биосинтез флавоноидов, халконсинтаза CHS, стрессовый ответ, чеснок *Allium sativum* L.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CHS – халконсинтаза; АБК – абсцизовая кислота; MeJA – метилжасмонат; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением флавоноидов – класса растительных полифенолов, состоящего более чем из 6900 вторичных метаболитов с широким спектром функций в развитии растения [1, 2]. Обладая антиоксидантной активностью [3, 4], флавоноиды играют важную роль в защите растений от биотических и абиотических стрессовых факторов [5, 6], а также способны оказывать на организм человека антиоксидантное, иммуномодулирующее, антибактериальное и другие действия [7].

Путь биосинтеза флавоноидов высококонсервативен, и у многих видов растений к настоящему времени идентифицированы как структурные (ферменты) гены, определяющие разные стадии биосинтеза, так и гены, координирующие активность структур-

ных генов [8–12]. Ключевыми ферментами пути являются халконсинтазы (CHS; [К.Ф. 2.3.1.74]), с которых начинается биосинтез флавоноидов и которые структурно консервативны у растений [7, 13–15]. На примере множества видов растений показано, что гены *CHS* представлены в геноме семейством паралогичных копий, возникших в результате эволюционных дупликаций и мутаций генов-предшественников [16–21]. Количество членов семейства *CHS* значительно варьирует у разных видов растений, что объясняется эволюционными событиями дупликации и мутациями генов *CHS* с последующей функциональной диверсификацией паралогов [10, 22, 23].

Один из экономически значимых видов однодольных растений – чеснок *Allium sativum* L. (семейство Amaryllidaceae, порядок Asparagales), является не только важной овощной культурой, но и исполь-

зуется в медицине, благодаря своим антиоксидантным свойствам [24]. Луковицы чеснока богаты, в числе прочих антиоксидантов, флавоноидами (особенно кверцетином) [24].

Уникальность вида *A. sativum* заключается в свойственном ему бесполом размножении; редкие фертильные образцы, собранные в Центральной Азии, при искусственном культивировании быстро теряют репродуктивную способность [25]. Новые генотипы чеснока возникают как результат мутаций в вегетативных клонах, приводящих к фенотипическим изменениям [26]. Успеху отбора способствует свойственная *A. sativum* высокая скорость изменчивости морфофизиологических признаков [25, 27], в том числе при адаптации к различным неблагоприятным условиям [25], что связывают с эволюцией флавоноидного пути [28].

Таким образом, изучение генов пути биосинтеза флавоноидов у *A. sativum*, в частности, генов семейства халконсинтаз, *CHS*, может стать вкладом в понимание регуляции данного метаболического пути, а также эволюции и особенностей онтогенеза этого вида. Кроме того, это откроет новые возможности в характеристике мировых коллекций чеснока и отборе стрессоустойчивых генотипов с одновременно улучшенной диетической составляющей для создания сортов. Гены *CHS* у чеснока ранее не изучались. Если рассматривать другие виды *Allium*, то только у лука репчатого (*A. cepa*) идентифицированы гомологи *CHS-A* и *CHS-B*, ассоциированные с окраской луковицы [29], и выявлена активация экспрессии гена *CHS* в ответ на грибную инфекцию [30]. Полное семейство *CHS* (шесть генов) идентифицировано только у одного из видов, наиболее близких к роду *Allium* – *Asparagus officinalis* (порядок Asparagales) [18]. В то же время в 2020 г. был секвенирован и собран геном *A. sativum*, а также секвенированы транскриптомы отдельных органов растения чеснока [31], что делает возможной идентификацию и характеристику генных семейств.

В представленной работе идентифицировано и охарактеризовано семейство генов *CHS*, кодирующих халконсинтазы чеснока, а также изучена динамика экспрессии этих генов в ответ на воздействие абиотических стрессоров (засуха, засоление, холод) и обработку фитогормонами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Идентификация и структурная характеристика генов *CHS* чеснока

Поиск генов проводили в геноме и транскриптомах *A. sativum* сорта Ershuizao (PRJNA606385, Garlic.V2.fa; AlliumDB, <https://allium.qau.edu.cn/>). В ка-

честве референсных использовали халконсинтазы *Arabidopsis thaliana* L. (AT1G02050, AT4G00040, AT4G34850 и AT5G13930).

Выравнивание последовательностей выполняли в MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Экзон-интронную структуру генов *AsCHS* определяли, сравнивая геномные и транскриптомные данные (PRJNA606385, Garlic.V2.fa), *cis*-регуляторные элементы в промоторах генов *AsCHS* (2 т.п.н. до старт-кодона) – с помощью PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Для характеристики белков *AsCHS* определяли: консервативные домены и мотивы (NCBI-CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation (MEME) 5.5.7, <http://meme-suite.org/tools/meme>; опубликованные данные [10]); молекулярную массу (Mw), изоэлектрическую точку (pI) и индекс гидропатичности (grand average of hydrophobicity index, GRAVY) (ExpASy, <https://web.expasy.org/protparam/>); функции *AsCHS* (PANNZER, <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/sanspanz/>). Филогенетический анализ халконсинтаз проводили (MEGA 7.0, Neighbor-Joining, бутстреп 1000), используя сравнение аминокислотных последовательностей *AsCHS* с гомологами из *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum* L. (томат), *Capsicum annuum* L. (перец) (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *A. cepa* (лук репчатый) и *A. fistulosum* (лук-батун) (AlliumDB, <https://allium.qau.edu.cn/>).

Анализ профиля экспрессии генов *CHS* в различных органах растения чеснока

Экспрессию идентифицированных генов *AsCHS* в органах чеснока определяли *in silico* на основе доступных транскриптомных данных *A. sativum* сорта Ershuizao [31] и визуализировали в виде тепловой карты (Heatmapper, <http://www.heatmapper.ca/expression/>). Экспрессию выражали в значениях FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments).

Профиль экспрессии генов *AsCHS* методом ПЦР-РВ анализировали в корнях, донце, луковице, ложном стебле и листьях растений чеснока сорта Сармат, выращенных в открытом грунте в 2024 г. (Федеральный научный центр овощеводства, Московская область). Материал растирали в жидком азоте и использовали для получения суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия) и кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). На основе идентифицированных последовательностей *AsCHS* разрабатывали специфичные праймеры (табл. 1). В качестве референсных генов использовали

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для проведения ПЦР-РВ

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')*
<i>AsCHS1</i>	F-CGAAGGCCAGCCACCATT R-CGGTCATGTGCTCGCTGTTG
<i>AsCHS2</i>	F-CACCAACTGCAACAACCTTGAC R-CTCCGGGTATGTGGCCAGT
<i>AsCHS3</i>	F-CAAGACGAATACCCAGACTACTAT R-GATGTCTTCGGACAGGTGCATA
<i>AsCHS4</i>	F-GTACCCAGACTACTACTTCCGT R-ATCTTCGGACAGGTGCATGTAC
<i>AsCHS5</i>	F-GTACCCAGACTACTACTTCCGT R-CAGGTGCATGTAGCGTTTCTG
<i>AsCHS6</i>	F-CTCTTCTGGATTCCGCATCCT R-CTGCCATTGACCTCTTCTCA
<i>AsCHS7</i>	F-GCACCGATCTCGCCATGAG R-TAAGCGCTGTTTGATGGTTCGG
<i>AsCHS8</i>	F-CTATCGGTACAGCCGTGCCT R-CATGTAGGCCGTCATGTTTGG
<i>GAPDH</i>	F-CCATGTTTGTGTTGGTGTGAATGAG R-TGGTGCAGCTAGCGTTGGAGAC
<i>UBQ</i>	F-AAGCCAAGATACAGGACAAG R-GCATACCACCTCTCAATCTC

*F – прямой праймер, R – обратный праймер.

GAPDH и *UBQ* [32, 33]. Реакционная смесь включала 3 нг кДНК и набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия). Реакцию проводили в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США), в двух биологических и трех технических повторах; программа: 95°C 5 мин; 40 циклов (95°C 15 с, 62°C 50 с). Данные статистически обрабатывали (Two-way ANOVA) и визуализировали в GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

Симуляция стрессовых условий (засуха, засоление, холод, абсцизовая кислота, метилжасмонат, затемнение) для растений чеснока и анализ ответной динамики экспрессии генов *AsCHS*

В эксперименте использовали 10-дневные растения сорта Сармат, выращенные (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м²·с)) в прозрачных стеклянных стаканах в воде; зубки луковицы закрепляли так, чтобы в воде находилась только зона корней. Опытные растения помещали в растворы, соответствующие моделируемым стрессам (100 мМ NaCl – засоление; 10% PEG-6000 – засуха) и экзогенному воздействию фитогормонов (100 мкМ АБК; 100 мкМ MeJA). Контрольные растения оставались в воде. Холодовой стресс имитировали, помещая

растения в холодильную камеру (4°C, без освещения); контроль – в темноте при 22°C. Через 6 и 24 ч воздействия стресса/гормона отбирали корни и побеги с трех случайно выбранных растений в опыте и контроле; хранили при -80°C.

В опыте с отсутствием освещения растения накрывали светонепроницаемой коробкой (опыт) (10:00); контроль находился при освещении 190 мкМ/(м²·с) (ЭУИК, день/ночь – 16/8 ч). Через 6 ч (16:00) и 24 ч (10:00 следующих суток) отбирали корни и листья в опыте и контроле (по два биологических повтора на каждую точку), хранили при -80°C.

Собранные пробы использовали для выделения РНК/кДНК и проведения ПЦР-РВ как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и структурная характеристика генов *AsCHS* чеснока

Халконсинтазы входят в семейство поликетидсинтаз типа III, состоят из двух консервативных доменов *Chal_sti_synt_N* (PF00195.16) и *Chal_sti_synt_C* (PF02797.12) и в составе гомодимера катализируют присоединение трех молекул малонил-КоА к 4-кумароил-КоА с образованием халкона [3, 14]. Каждый компонент димера имеет активный центр, катализирующий одну или несколько реакций конденсации [14]. Каталитический центр CHS содержит четыре высококонсервативных а.о. (Cys164, His303, Asn336, Phe215 у *CHS1 Glycin max*) [7, 15], где Cys164 также является сайтом связывания с субстратом 4-кумароил-КоА [14]. В связывании с 4-кумароил-КоА участвуют Gly259 и Ser345, а с субстратом малонил-КоА – консенсусная последовательность из 17 а.о. [10]. Кроме того, для халконсинтаз предложена сигнатурная последовательность из 17 а.о. в домене *Chal_sti_synt_C* [10].

В геноме чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao [31] нами идентифицированы восемь генов халконсинтаз – *AsCHS1–8* (1182–2010 п.н.), которые содержали от одного до трех экзонов и располагались на хромосомах Chr1 (*AsCHS1*), Chr4 (*AsCHS2*, 3), Chr5 (*AsCHS4*, 5) и Chr6 (*AsCHS6–8*) (табл. 2) (рис. 1А).

Белки *AsCHS1–8* незначительно различались размером (375–397 а.о.). Согласно функциональным предсказаниям в терминах Gene Ontology (GO), все *AsCHS1–8* имеют ацилтрансферазную активность (GO:0016747) и участвуют в процессах биосинтеза поликетидов (GO:0030639) и флавоноидов (GO:0009813). При этом белки *AsCHS2* и 7 имели сходство 75% и значительно отличались от халконсинтаз *AsCHS1*, 3–6, 8 (идентичность 56–61%).

Таблица 2. Характеристика генов халконсинтаз чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao

Ген ¹	Ген/ транскрипт ID ²	Локализация в геноме ²	Ген, п.н.	Число экзонов/ интронов	кДНК, п.н.	Белок, а.о.	Mw, кДа	pI	GRAVY
<i>AsCHS1</i>	Asa1G03363.1/ Asa2G01293.1	chr1: 913472045..913473226	1182	1/0	1182	393	43.26	6.22	-0.139
<i>AsCHS2</i>	Asa4G02924.1/ Asa4G00890.1	chr4: 781174614..781176037	1424	3/2	1128	375	41.06	6.96	-0.084
<i>AsCHS3</i>	Asa4G06151.1/ Asa4G03387.1	chr4: 1682101557..1682102738	1182	1/0	1182	393	43.15	6.48	-0.121
<i>AsCHS4</i>	Asa5G04529.1/ Asa5G01644.1	chr5: 1227135621..1227136805	1185	1/0	1185	394	43.46	6.1	-0.179
<i>AsCHS5</i>	Asa5G04530.1/ Asa5G01645.1	chr5: 1227252338..1227253522	1185	1/0	1185	394	43.43	6.1	-0.177
<i>AsCHS6</i>	Asa6G02586.1/ Asa6G05452.1	chr6: 656216362..656217943	1582	3/2	1173	390	43.32	5.75	-0.126
<i>AsCHS7</i>	Asa6G03080.1/ Asa1G04064.1	chr6: 787943706..787944950	1245	2/1	1155	384	42.27	5.57	-0.155
<i>AsCHS8</i>	Asa6G03715.1/ Asa6G04348.1	chr6: 973362901..973364911	2010	2/1	1194	397	43.78	6.48	-0.186

¹Номера в названиях генов соответствуют их хромосомной локализации.
²Определено по данным секвенирования генома и транскриптомов чеснока [31].

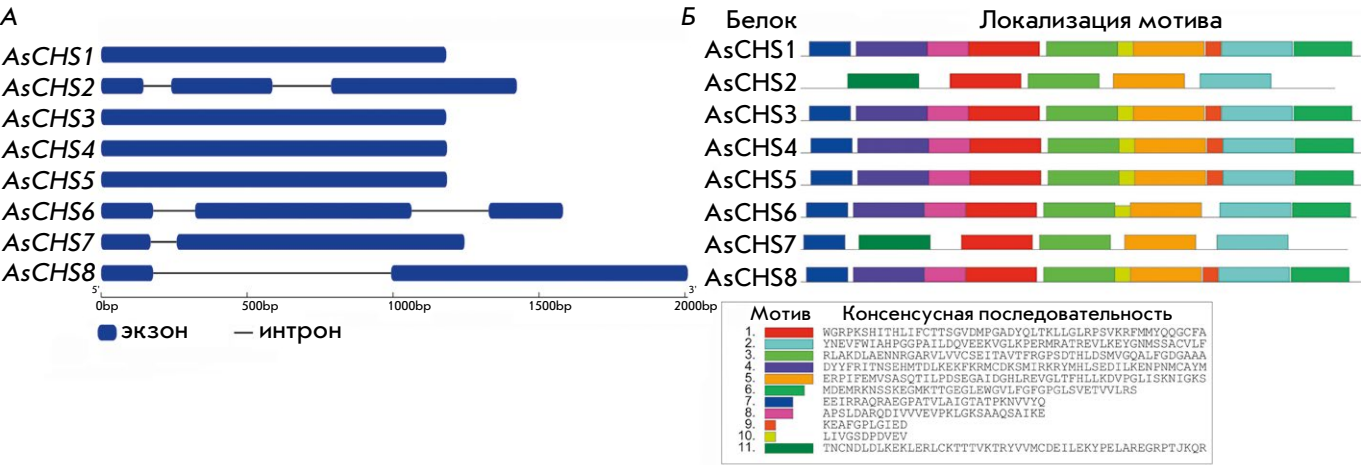


Рис. 1. Экзон-интронная структура генов *AsCHS1–8* (А), состав и распределение консервативных мотивов в последовательностях белков *AsCHS1–8* (Б)

Структурный анализ аминокислотных последовательностей *AsCHS1–8* установил положение халконсинтазных доменов *Chal_sti_synt_N* (PF00195.16) и *Chal_sti_synt_C* (PF02797.12) (рис. 1). В доменах найдены консервативные остатки (Cys167, Phe218 (*Chal_sti_synt_N*); His309, Asn342 (*Chal_sti_synt_C*)), характерные для активного центра фермента [15], за исключением *AsCHS3* (Phe218→Cys). Сайты связывания с субстратом 4-кумароил-КоА – Cys167 [14], Gly259 и Ser345 [10] присутствовали у всех *AsCHS1–8*, за исключением мутации Gly259→Lys у *AsCHS6*. В домене *Chal_sti_synt_C* все *AsCHS1–8* содержали консенсус связывания с субстратом малонил-КоА и сигнатурную последовательность халконсинтаз (рис. 2).

Последовательности белков *AsCHS1–8* охарактеризованы по профилю консервативных мотивов/

консенсусов (рис. 1Б). Большинство халконсинтаз (*AsCHS1*, 3–5, 8) содержали 10 из 11 найденных мотивов; *AsCHS6* отличался только отсутствием мотива 9. Исключение составили *AsCHS2* и *AsCHS7* (пять и шесть мотивов вместо 10–11), однако в последовательности именно этих белков специфично присутствовал мотив 11, соответствующий измененному (в сравнении с другими белками) началу домена *Chal_sti_synt_N*; консенсус 7 отсутствовал у *AsCHS2* по причине делеции начала домена *Chal_sti_synt_N*. Мотивы 6 и 8–10 были утрачены *AsCHS2* и *AsCHS7* вследствие того, что консервативность данных участков составила <50% в сравнении с остальными халконсинтазами (рис. 1, 2).

С целью исследования филогении халконсинтаз *AsCHS1–8* чеснока в базах данных AlliumDB и NCBI были идентифицированы последователь-

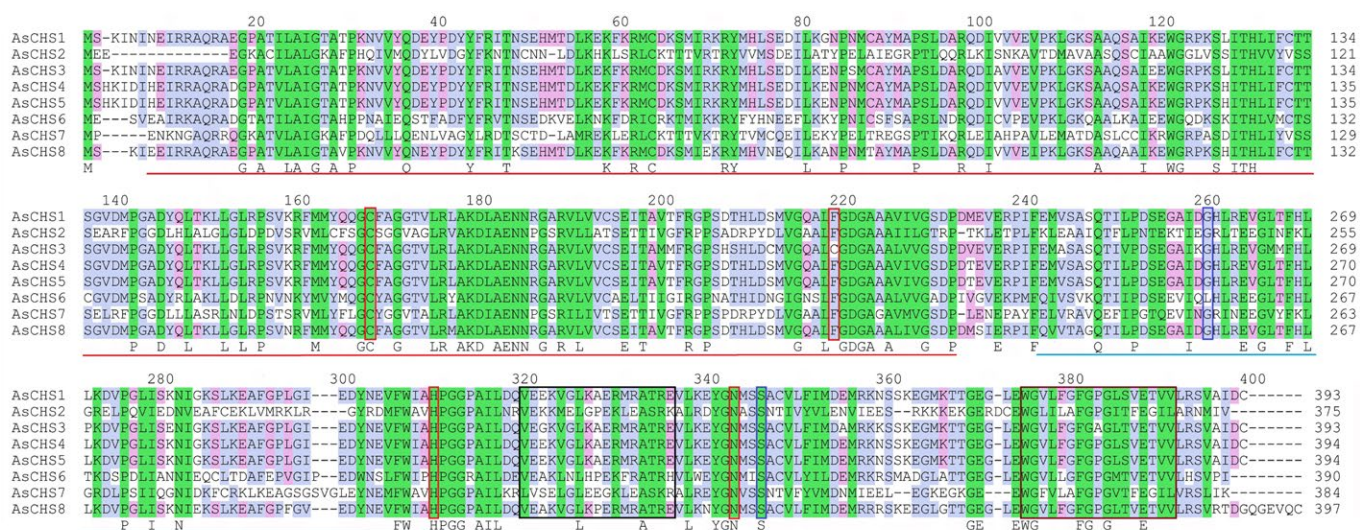


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей AsCHS1–8. Подчеркнуты домены *Chal_sti_synt_N* (красным) и *Chal_sti_synt_C* (голубым). Четыре остатка (Cys167, Phe218, His309, Asn342) активного центра фермента выделены красной рамкой (согласно [15]). Остатки Ser345 и Gly259, участвующие в связывании субстрата 4-кумарил-КоА [10], выделены синей рамкой. Черной и коричневой рамками отмечены консенсусы связывания малонил-КоА и сигнатурная последовательность халконсинтаз соответственно [10]. Цвет фона указывает на высокую степень консервативности аминокислотных остатков в белках AsCHS1–8 (зеленый – 100%, голубой – 80%, розовый – 60%)

ности этих ферментов у наиболее родственных *A. sativum* видов – лука репчатого *A. cepa* (6 CHS), лука-батун *A. fistulosum* (5) и спаржи *As. officinalis* (6), а также отдаленных видов – перца *C. annuum* (9), томата *S. lycopersicum* (7) и *A. thaliana* (4).

На построенной дендрограмме (рис. 3) белки AsCHS1–8 группировались с представителями других видов однодольных (*A. cepa*, *A. fistulosum*, *As. officinalis*). Ортологи AsCHS6–8 выявлены у всех трех видов, AsCHS2 – только у *A. cepa*, тогда как AsCHS1, 3–5 группировались отдельно от представителей и однодольных, и двудольных (рис. 3).

В геномах двудольных (*C. annuum*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*) найдены ортологи только халконсинтаз AsCHS2 и 7 чеснока (рис. 3).

Определение профиля экспрессии генов AsCHS в растениях чеснока

Профили экспрессии генов халконсинтаз определяли, используя результаты транскриптомного анализа отдельных органов *A. sativum* сорта Ershuizao [31], включая восемь стадий развития луковицы (рис. 4).

Оказалось, что гены AsCHS2 и AsCHS7 не экспрессируются, за исключением следовых количеств транскриптов в цветках (оба гена), корнях и луковице на отдельных стадиях развития (AsCHS7). Экспрессия остальных шести генов крайне незначительна в корнях, листьях, ложном стебле, цвет-

ках и в процессе развития луковицы (AsCHS1, 3–6), а также в бутонах (кроме AsCHS5) и проростках (кроме AsCHS1). Среди генов AsCHS1–7, несмотря на низкий уровень их экспрессии, можно выделить AsCHS3 (FPKM значимо выше, чем у других пяти генов, но <10) (рис. 4).

Только у гена AsCHS8 выявлены существенные уровни транскриптов (FPKM>10). Ген AsCHS8 экспрессируется во всех проанализированных органах с наибольшими значениями FPKM в ложном стебле, листьях, цветках и проростках; в луковице экспрессия минимальна на протяжении всех восьми стадий развития; в корнях FPKM в ~9 раз меньше, чем в листьях (рис. 4).

Методом ПЦР-РВ нами определены профили экспрессии генов AsCHS1–8 в корнях, донце (видоизмененный стебель), луковице, ложном стебле и листьях чеснока сорта Сармат. Обнаружена экспрессия двух из восьми генов, AsCHS3 и 8. Транскрипты AsCHS3 присутствуют во всех анализируемых органах (максимум в луковице, листьях и ложном стебле), тогда как AsCHS8 – только в корнях, листьях и ложном стебле (максимум в ложном стебле и листьях). В корнях оба гена экспрессируются на следовом уровне, но экспрессия AsCHS3 в 26 раз ниже, чем AsCHS8. В ложном стебле и листьях уровни транскриптов AsCHS8 в ~41 раз выше, чем у AsCHS3 (рис. 5А).

Рис. 3. Дендрограмма, основанная на аминокислотных последовательностях халконсинтаз

A. sativum (As; красный шрифт), *A. cepa* (синий), *A. fistulosum* (зеленый), *As. officinalis* (голубой), *A. thaliana* (AT; черный), *C. annuum* (оранжевый) и *S. lycopersicum* (фиолетовый). Значимые значения бутстреп (>50%) указаны в основании ветвей, длина которых соответствует количеству мутаций в ходе эволюции

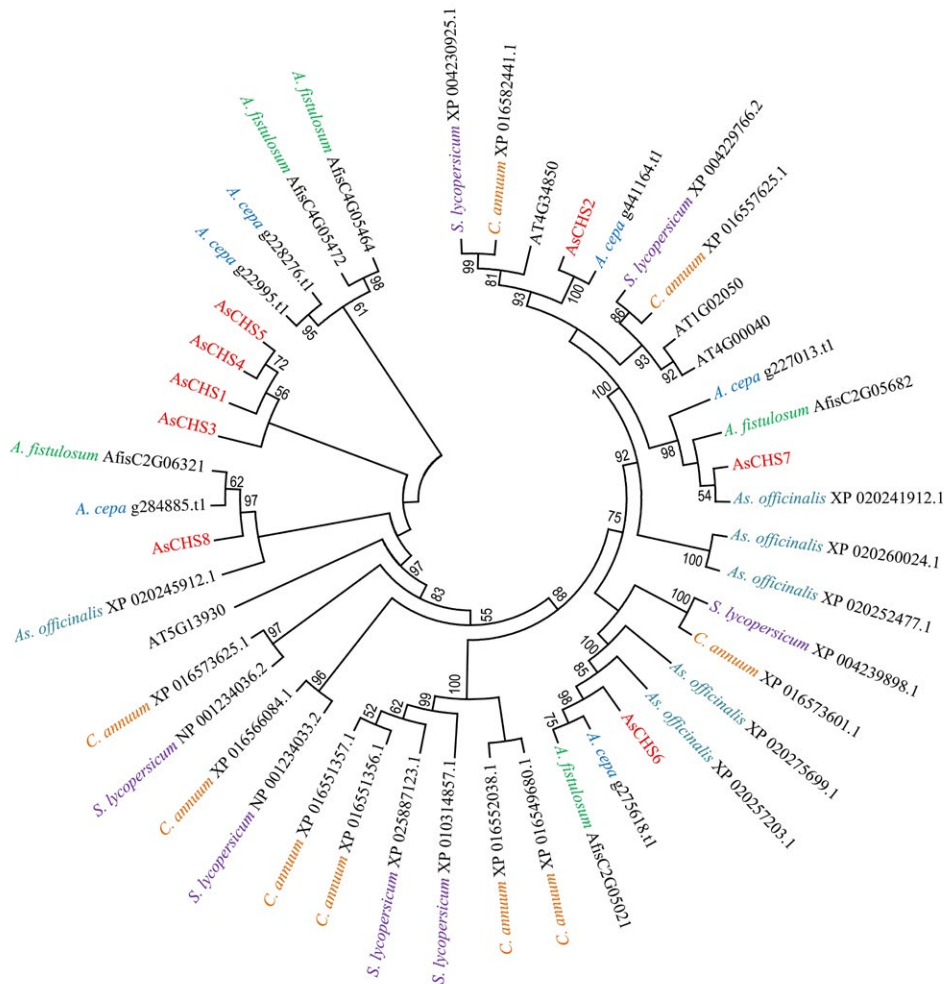
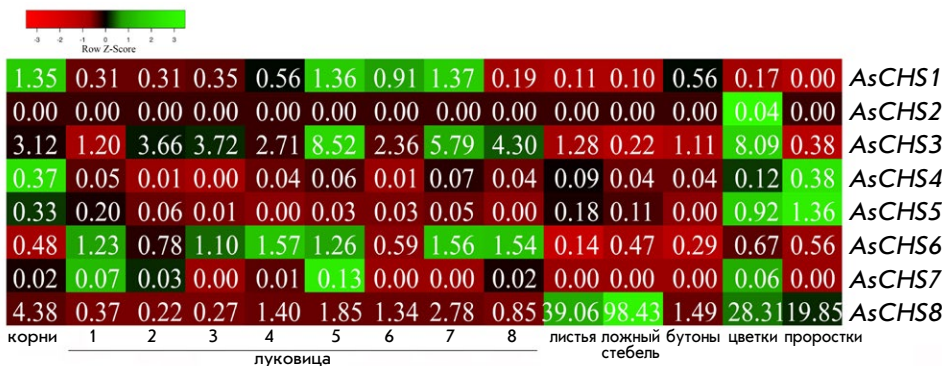


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии генов *AsCHS1–8* в разных органах *A. sativum* сорта Ershuizao, построенная по транскриптомным данным [31]. В прямоугольниках – средние значения ФРКМ по трем биологическим повторам. Приведены стадии развития (1–8) луковиц, возраст которых составил 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дней соответственно [31]



Динамика экспрессии генов *CHS* в растениях чеснока в ответ на стрессоры и фитогормоны

С целью определения возможного участия халконсинтаз *AsCHS1–8* в стрессовом ответе чеснока сорта Сармат мы провели серию экспериментов по симуляции воздействия на растения засоления, засухи и низкой положительной температуры, а также экзогенной обработки абсцизовой кислотой и метил-

жасмонатом, проанализировали экспрессию генов *AsCHS1–8* в корнях и листьях в динамике.

Показано, что только ген *AsCHS8* значимо экспрессируется как в контроле, так и в опыте (рис. 5Б). В листьях в ответ на холодостресс появляются следовые количества транскриптов *AsCHS2–4* (в связи с незначительностью индукции генов рисунки не приведены и эффект не обсуждается).

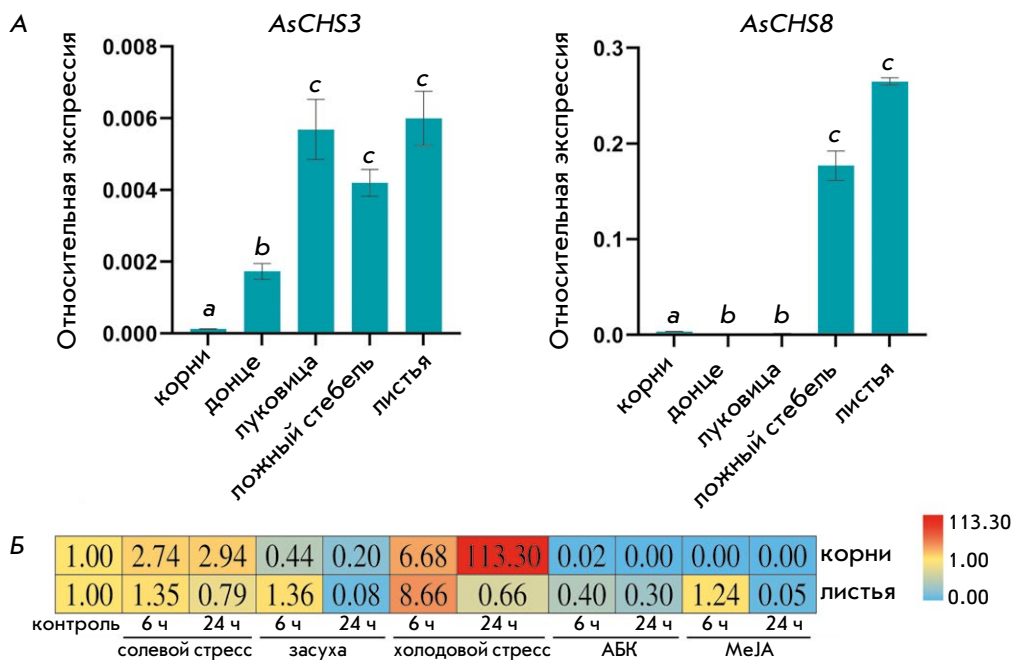


Рис. 5. А — профиль экспрессии генов *AsCHS3* и 8 в разных органах взрослого растения чеснока сорта Сармат ($a-c p < 0.05$ — значимые различия уровня экспрессии в разных органах). Экспрессии генов *AsCHS1, 2, 4–7* не обнаружено. Б — динамика экспрессии гена *AsCHS8* в корнях и листьях растений чеснока в ответ на абиотические стрессы (засоление, засуха, холод) и экзогенные фитогормоны (АБК, MeJA)

Профиль экспрессии гена *AsCHS8* в ответ на стрессовые воздействия зависит как от типа стрессора, так и от органа растения (корни или листья).

Избыток соли в основном стимулирует экспрессию *AsCHS8* и в корнях, и в листьях. В корнях экспрессия гена возрастает в 2.7 (6 ч) и 2.9 (24 ч) раза в сравнении с контролем; в листьях — повышается в 1.3 раза (6 ч), но понижается в 1.2 раза к концу воздействия (24 ч) (рис. 5Б).

В условиях засухи экспрессия *AsCHS8* в корнях стабильно снижается (6 и 24 ч), тогда как в листьях сначала наблюдается активация экспрессии в 1.3 раза (6 ч) и затем резкое снижение почти до нулевых значений (24 ч) (рис. 5Б).

Холодовой стресс стимулирует экспрессию *AsCHS8* в начале воздействия (6 ч) в корнях (в 6.6 раз) и листьях (8.6). В конце воздействия (24 ч) уровень транскриптов гена в корнях возрастает в 113.3 раз, а в листьях уменьшается в 1.5 раза (рис. 5Б).

Таким образом, если говорить о тенденции изменения экспрессии гена, то все три вида абиотических стрессоров сходным образом влияют на экспрессию *AsCHS8* в листьях, в то время как эффект, оказываемый на корни, специфичен для каждого стрессора.

Экзогенная обработка растений чеснока абсцизовой кислотой и метилжасмонатом подавляет экспрессию *AsCHS8* в корнях до нулевых значений. В листьях экспрессия гена существенно снижается на протяжении 24 ч при воздействии АБК,

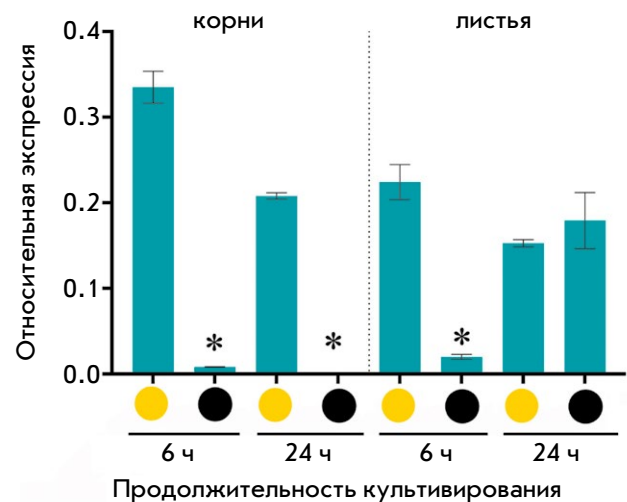


Рис. 6. Экспрессия гена *AsCHS8* в корнях и листьях растений чеснока спустя 6 и 24 ч культивирования при наличии освещения (желтый круг) и в темноте (черный круг). (* $p < 0.05$ — значимые различия уровня экспрессии, темнота vs. освещение)

в то время как MeJA вызывает сначала увеличение уровня транскриптов в 1.2 раза (6 ч) и затем уменьшение до следовых количеств (24 ч) (рис. 5Б).

Также проведен анализ зависимости экспрессии гена *AsCHS8* от наличия освещения корней и листьев растений, помещенных в стандартные условия освещения (контроль) и темноту (опыт) (рис. 6). Обнаружено, что в корнях контрольных (освещенных) растений ген *AsCHS8* экспрессируется, тогда

как в темноте следовые количества транскриптов регистрируются только спустя 6 ч воздействия. В листьях *AsCHS8* экспрессируется и в контроле, и в опыте: в точке 6 ч уровень транскриптов гена в 11.2 раза ниже в условиях темноты в сравнении с освещенными листьями; спустя сутки (24 ч) уровни транскриптов *AsCHS8* в контроле и опыте сходны (рис. 6).

Определение цис-регуляторных элементов в промоторах генов *AsCHS1–8*

С целью интерпретации профилей экспрессии генов *AsCHS1–8* их промоторы (–2000 п.н. от стартового кодона) охарактеризованы по профилю цис-регуляторных элементов (рис. 7). Найдены 44 элемента, которые распределены на четыре группы: элементы ответа на фитогормоны (7) и стрессовые факторы (11), а также светочувствительные (13) и другие (13) элементы. К последним отнесены сайты связывания с белками и транскрипционными факторами, элементы, ассоциированные с процессами развития, и потенциальные регуляторные мотивы с неизвестной функцией.

Показано, что в промоторах большинства генов (кроме *AsCHS3*) присутствуют фитогормон-чувствительные элементы с преобладанием среди них сайтов ответа на абсцизовую кислоту и метилжасмонат. Гены *AsCHS1*, 2 и 7 содержат наибольшее количество элементов ответа на АБК (3 'ABRE');

AsCHS2 – на MeJA (4 'CGTCA'). Элементы, ассоциированные с ауксинами ('TGA'), гиббереллинами ('P-box', 'GARE'), салициловой кислотой ('TCA') и этиленом ('ERE'), представлены в промоторах отдельных генов в одной-двух копиях (рис. 7).

В промоторах всех генов *AsCHS1–8* выявлены элементы, связанные с ответом на стресс в целом ('MBS', 'W-box', 'TC-rich repeats'), на анаэробные условия ('ARE', особенно *AsCHS7* с 6 сайтами), фитопатогены ('Wun', 'WRE3', 'box S'), холод ('LTR'), засуху ('DRE1'), осмотический стресс, жару и дефицит питательных элементов ('STRE'). Наибольшее число элементов (14) найдено у *AsCHS8*. Учитывая стрессовые факторы, использованные в нашей работе, отметим, что элементы 'LTR' (ответ на холод) обнаружены у *AsCHS2*, 4, 5 и 7; 'DRE1' и/или 'STRE' (ответ на осмотический стресс) – у всех генов, кроме *AsCHS4* и 5 (рис. 7).

Проведенный анализ показал, что промоторные области *AsCHS1–8* содержат от 4 (*AsCHS4*) до 14 (*AsCHS8*) светочувствительных элементов (рис. 7).

У всех генов найдены сайты связывания со стресс-ассоциированными факторами транскрипции семейств MYB ('MRE', 'MYB', 'MBS1') и MYC ('MYC') – 5–14 и 2–8 элементов соответственно. MYB-связывающими сайтами наиболее обогащены промоторы генов *AsCHS2* (14), 7 (10) и 4 (9); промоторы *AsCHS2–5* содержат 'MBS1', ассоциированный с регуляцией биосинтеза флавоноидов (рис. 7).

А

	Ответ на гормоны							Ответ на стрессы							Элементы ответа на свет										Другие элементы																					
	ABRE	CGTCA-motif	TCA-element	ERE	P-box	GARE-motif	TGA-box	ARE	LTR	STRE	TC-richrepeats	W-box	Wun-motif	box S	WR3	DRE 1	GC-motif	MBS	AE-box	Box 4	Box II	G-box	I-box	GA-motif	GATA-motif	GT1-motif	TCT-motif	dhc-CMA1a	TCCC-motif	AT1-motif	MRE	MYB	MBS1	MYC	AAGA-motif	TCA	Box III	HD-Zip 3	AT-rich element	CTAG-motif	A-box	MSA-like	GCm4-motif	CAT-box		
AsCHS1	3	1		2	1			1		2							1	3	1	3		2				1	1				1	6		5										1	1	
AsCHS2	3	4	2			2		1	1	1		3						2		1		2	5		2					1		1	7													
AsCHS3								1		1				1					1	3		1	1		1		1	1	1	1	1	5	1	2	4	4	1	1	1					1		
AsCHS4		1						1	1	1		3							1	3													4	1	7	1										
AsCHS5	2	1		2	1			1	1			1						2	2	2		2			2	3	3	2				8	1	8	1	1				1	1				1	
AsCHS6	1		2	1	1			2		1		2						1				1				3	1				1	5	5								1					
AsCHS7	3	1					1	6	2	2					1			2	3	2						1						10		4												1
AsCHS8	2	1	1	1				2	2		2	2	1	2	1	1	1	1	4	1	4			1	1	2					1	6		4		1										

Б

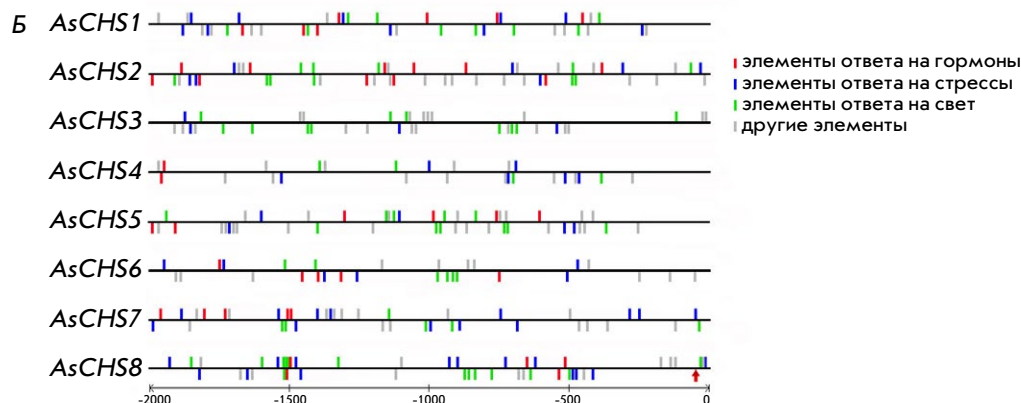


Рис. 7. Содержание и состав цис-регуляторных элементов в промоторах (2 т.п.н. до стартового кодона, включая предположительную 5'-не-транспируемую область (5'-UTR)) генов *AsCHS1–8* (А) и их распределение по последовательности промотора (Б). Красной стрелкой указан предполагаемый сайт начала транскрипции гена *AsCHS8* (на основании анализа транскриптомных данных)

ОБСУЖДЕНИЕ

Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением метаболитов с антиоксидантными свойствами, в частности флавоноидов [5, 6]. У чеснока *A. sativum*, утратившего в процессе эволюции и доместикации фертильность, возникли, как следствие, серьезные изменения генетической регуляции адаптации к стрессу [34]. Флавоноидный путь у чеснока не охарактеризован. Поэтому целью нашего исследования стали идентификация и структурно-функциональная характеристика генов *A. sativum*, кодирующих халконсинтазы, которые катализируют первую стадию пути биосинтеза флавоноидов [12].

Анализ генома и транскриптомов *A. sativum* сорта Ershuizao позволил выявить восемь генов халконсинтаз *AsCHS1–8* (табл. 2). Число генов этого семейства в геноме чеснока отличалось от числа генов у других однодольных, таких как пшеница *T. aestivum* (49 или 87 генов) или кукуруза *Z. mays* (17). Однако размеры этого семейства у *A. sativum* и у одного из видов, наиболее близких роду *Allium* – *As. officinalis* (шесть генов), оказались близкими [18, 21]. Поскольку высокая фенотипическая вариабельность современного чеснока считается следствием перекрестных скрещиваний фертильных диких предков в центре происхождения вида [25, 34], можно предположить, что семейство *AsCHS* появилось в геноме чеснока еще до утраты видом способности к половому размножению.

Опираясь на результаты структурно-филогенетического анализа (табл. 2, рис. 1, 3), можно было бы предположить, что высокоомологичные белки *AsCHS1, 3–5* функционально избыточны и могут работать с частичным перекрытием в разных тканях/органах растения, что определяется специфичностью промоторов генов. Соответствующие гены значительно различаются набором *цис*-регуляторных элементов в промоторной области (рис. 7) и профилем органоспецифичной экспрессии (рис. 4), основанным на транскриптомных данных *A. sativum* сорта Ershuizao [31]. Участие генов в биосинтезе флавоноидов может быть ограничено отдельными узкоспециализированными клетками/тканями/органами/стадиями развития растения чеснока. Выявленные мутации значимых аминокислотных остатков у *AsCHS3* и 6 (рис. 2), необходимых для формирования субстрат-связывающих сайтов, могут также свидетельствовать о возможных различиях ферментативной активности этих белков [10, 15].

В целом, если рассматривать экспрессию всех анализируемых генов *AsCHS* (рис. 4), то можно говорить о существенной экспрессии только *AsCHS8*

($FPKM > 10$) и, в меньшей степени, *AsCHS3* (рис. 4). Это полностью подтверждается результатами ПЦР-РВ, согласно которым экспрессируются только гены *AsCHS3* и 8 с весомым преобладанием транскриптов *AsCHS8* в корнях, ложном стебле и листьях чеснока сорта Сармат (рис. 5А).

Отсутствие или низкая экспрессия остальных генов *AsCHS1, 2* и 4–7 еще не является свидетельством их нефункциональности. Все эти гены структурно полноценны, включая профиль *цис*-регуляторных элементов в промоторной области (табл. 2, рис. 7), они могут иметь узкую специализацию, участвуя в флавоноидном пути в конкретных клетках/тканях/органах на отдельных стадиях развития растения. К примеру, у пшеницы ряд генов халконсинтаз экспрессируется исключительно в клетках пыльников при развитии пыльцевой экины [21].

Нами проведен дополнительный анализ экспрессии генов *AsCHS1–8* в ответ на основные абиотические стрессоры (засоление, засуха, холод), а также на экзогенную обработку фитогормонами (абсцизовая кислота и метилжасмонат), которые опосредуют сигнальные пути стрессовых ответов в растении [35]. В результате обнаружено, что только экспрессия гена *AsCHS8* значительно изменяется в ответ на воздействие всех использованных нами стрессоров (рис. 5Б).

Показанное нами стимулирующее воздействие холода на активность гена *AsCHS8* (рис. 5Б) соответствует данным подобных исследований, проведенных, например, на растениях *Coelogyne ovalis* [36] или *Oryza sativa* [37]. Повышение экспрессии гена *AsCHS8* при засолении (рис. 5Б) согласуется с данными, полученными при изучении реакции растений риса [37], а также с положительной ассоциацией между экспрессией генов халконсинтаз и солеустойчивостью растений *Eupatorium adenophorum* [38].

В отличие от солевого и холодового эффектов ответ на другой осмотический стресс – засуху, сопровождается снижением экспрессии гена *AsCHS8* (рис. 5Б). С одной стороны, это соответствует данным анализа растений *Camellia sinensis*, у которых в ответ на засуху уменьшалось содержание белка халконсинтаз [39]. С другой стороны, эффект *AsCHS8* противоположен реакции трех генов халконсинтаз *Silybum marianum*, экспрессия которых увеличилась в ответ на засуху [40].

Примечательно, что обработка растений чеснока абсцизовой кислотой и метилжасмонатом подавляет экспрессию гена *AsCHS8* как в корнях, так и в листьях (рис. 5Б). У видов *Vitis* sp. такие воздействия, напротив, стимулируют экспрессию генов халкон-

синтаз [41, 42]; в случае MeJA это ассоциировано с активацией жасмонатами биосинтеза антимикробных фитоалексинов для защиты от патогенов [41]. Возможно, противоположный эффект связан с тем, что растения чеснока богаты сераорганическими биологически активными соединениями, обладающими высокими антиоксидантными и противомикробными свойствами [43], и с тем, что для защитного ответа синтез флавоноидов, запускаемый у других видов растений жасмонатным сигнальным путем, не так важен. Более того, на примере *Salvia miltiorrhiza* показано, что обработка растений MeJA может и стимулировать (*SmCHS1–5*), и подавлять (*SmCHS6*), и не влиять (*SmCHS7*) на экспрессию генов халконсинтаз [44].

Известно, что флавоноиды участвуют в фотозащите растений [1, 2], при этом биосинтез флавоноидов находится в положительной зависимости от освещения [45], с чем ассоциированы светочувствительные *cis*-регуляторные элементы в промоторах генов халконсинтаз [7, 46]. Мы также обнаружили значительное количество светочувствительных сайтов в промоторах всех генов *AsCHS* и, в частности, *AsCHS8* (рис. 7), что согласуется с показанным нами подавлением экспрессии *AsCHS8* в затемненных растениях (рис. 6). Сходный профиль экспрессии генов халконсинтаз при наличии освещения и в темноте характерен и для других видов растений, например для *Sinapis alba* [45].

Таким образом, из всего семейства *AsCHS* только один ген (*AsCHS8*) участвует в защитных реакциях в листьях и корнях растения чеснока, причем ответная динамика экспрессии гена зависит от типа стрессора и часто противоположна. Эти данные могут косвенно подтверждать, что в процессе эволюции и доместикации в растениях чеснока возникли серьезные изменения в генетической регуляции адаптации к стрессу, отличные от других видов растений [34], что требует дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы идентифицировали и охарактеризовали восемь генов халконсинтаз (*AsCHS1–8*) в геноме чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao, сравнили профили их органоспецифичной экспрессии с профилями у сорта Сармат и проанализировали экспрессию генов в ответ на абиотические стрессоры (засоление, засуха, холод), экзогенные фитогормоны (АБК, MeJA) (все гены) и освещенность (только *AsCHS8*). Полученные результаты позволяют предположить, что только два гена из восьми – *AsCHS3* и 8, могут определять синтез флавоноидов во всех проанализированных органах в процессе развития растения чеснока, и основная халконсинтазная активность определяется *AsCHS8*, экспрессия которого в отдельных органах не только наиболее значима, но и чувствительна к воздействию стрессовых факторов. Остальные шесть генов (*AsCHS1, 2, 4–7*) могут участвовать в биосинтезе флавоноидов в узкоспециализированных клетках/тканях/органах или на отдельных стадиях развития растений чеснока. Проведенная идентификация и характеристика генов халконсинтаз *AsCHS1–8* чеснока могут стать основой для дальнейшего анализа механизмов регуляции стрессовой адаптации *A. sativum*, а также других видов *Allium*. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-76-10005; характеристика и анализ генов, экспрессионный анализ) и Министерства науки и высшего образования РФ (анализ экспрессии на основе данных транскриптомного анализа).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor L.P., Grotewold E. // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 317–323. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005
2. Mouradov A., Spangenberg G. // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. Article 620. doi: 10.3389/fpls.2014.00620
3. Petrucci E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 14950–14973. doi: 10.3390/ijms140714950
4. Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B. // Food Chem. 2022. V. 383. Article 132531. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531
5. Han Y.Y., Ming F., Wang W., Wang J.W., Ye M.M., Shen D.L. // Genetica. 2006. V. 128. P. 429–438. doi: 10.1007/s10709-006-7668-x
6. Khlestkina E. // Cereal Res. Commun. 2013. V. 41. P. 185–198. doi: 10.1556/CRC.2013.0004
7. Dao T.T., Linthorst H.J., Verpoorte R. // Phytochem. Rev. 2011. V. 10. № 3. P. 397–412. doi: 10.1007/s11101-011-9211-7
8. Shih C.H., Chu H., Tang L.K., Sakamoto W., Maekawa M., Chu I.K., Wang M., Lo C. // Planta. 2008. V. 228. № 6. P. 1043–1054. doi: 10.1007/s00425-008-0806-1
9. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 23. Article 12824. doi: 10.3390/ijms222312824
10. Zhu L., Ding Y., Wang S., Wang Z., Dai L. // Genes. 2022. V. 13. Article 2145. doi: 10.3390/genes13112145
11. Abe I., Morita H. // Nat. Prod. Rep. 2010. V. 27. № 6. P. 809–838. doi: 10.1039/b909988n

12. Singh B., Kumar A., Malik A.K. // *Electrophoresis*. 2017. V. 38. P. 820–832. doi: 10.1002/elps.201600334
13. Imaizumi R., Mameda R., Takeshita K., Kubo H., Sakai N., Nakata S., Takahashi S., Kataoka K., Yamamoto M., Nakayama T., et al. // *Proteins*. 2020. V. 89. № 1. P. 126–131. doi: 10.1002/prot.25988
14. Jez J.M., Bowman M.E., Noel J.P. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 49. P. 14829–14838. doi: 10.1021/bi015621z
15. Noel J.P., Ferrer J.-L., Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 775–784. doi: 10.1038/11553
16. Wu X., Zhang S., Liu X., Shang J., Zhang A., Zhu Z., Zha D. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 4. Article e0226537. doi: 10.1371/journal.pone.0226537
17. Jia Y.H., He F., Shen Z.L., Xie X.H., Lv S.J., Jiang B.X., Yang G.X., Yan Y.C., Wu Z.H., Wu Y.Y. // *Gene*. 2023. V. 857. Article 147176. doi: 10.1016/j.gene.2023.147176
18. Yang L., Zhang S., Chu D., Wang X. // *Front. Genet.* 2024. V. 15. Article 1368358. doi: 10.3389/fgene.2024.1368358
19. Han Y., Ding T., Su B., Jiang H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 2. Article 161. doi: 10.3390/ijms17020161
20. Glagoleva A.Y., Ivanisenko N.V., Khlestkina E.K. // *BMC Genet.* 2019. V. 20. Article 30. doi: 10.1186/s12863-019-0727-y
21. Liu Y., Bai J., Yuan S., Gao S., Liu Z., Li Y., Zhang F., Zhao C., Zhang L. // *Gene*. 2023. V. 888. Article 147740. doi: 10.1016/j.gene.2023.147740
22. Deng X., Bashandy H., Ainasoja M., Kontturi J., Pietiäinen M., Laitinen R.A.E., Albert V.A., Valkonen J.P.T., Elomaa P., Teeri T.H. // *New Phytol.* 2014. V. 201. № 4. P. 1469–1483. doi: 10.1111/nph.12610
23. Des Marais D.L., Rausher M.D. // *Nature* 2008. V. 454. P. 762–765. doi: 10.1038/nature07092
24. El-Saber Batiha G., Magdy Beshbishy A., Wasef L.G., Elewa Y.H.A., Al-Sagan A.A., Abd El-Hack M.E., Taha A.E., Abd-Elhakim Y.M., Prasad Devkota H. // *Nutrients*. 2020. V. 12. № 3. Article 872. doi: 10.3390/nu12030872
25. Shemesh E., Scholten O., Rabinowitch H.D., Kamenetsky R. // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1013–1024. doi: 10.1007/s00425-007-0675-z
26. Kırac H., Dalda Şekerci A., Coşkun Ö.F., Gülşen O. // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2022. V. 69. P. 1833–1841. doi: 10.1007/s10722-022-01343-4
27. Casals J., Rivera A., Campo S., Aymerich E., Isern H., Fenner D., Garriga A., Palou A., Monfort A., Howad W., et al. // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. Article 1004069. doi: 10.3389/fpls.2022.1004069
28. Buitrago S., Yang X., Wang L., Pan R., Zhang W. // *Plant Mol. Biol.* 2024. V. 115. № 1. Article 6. doi: 10.1007/s11103-024-01540-y
29. Kim S., Yoo K.S., Pike L.M. // *Euphytica*. 2005. V. 142. P. 273–282. doi: 10.1007/s10681-005-2239-2
30. Mollavali M., Perner H., Rohn S., Riehle P., Hanschen F.S., Schwarz D. // *Mycorrhiza*. 2018. V. 28. № 1. P. 59–70. doi: 10.1007/s00572-017-0799-3
31. Sun X., Zhu S., Li N., Cheng Y., Zhao J., Qiao X., Lu L., Liu S., Wang Y., Liu C., et al. // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. № 9. P. 1328–1339. doi: 10.1016/j.molp.2020.07.019
32. Liu M., Wu Z., Jiang F. // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435–444. doi: 10.1007/s11240-015-0780-9
33. Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F., Brummell D.A., Albert N.W., McCallum J.A., Pither-Joyce M., Crowhurst R.N., Eady C., Davies K.M. // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. Article 1865. doi: 10.3389/fpls.2016.01865
34. Shemesh-Mayer E., Faigenboim A., Sherman A., Gao S., Zeng Z., Liu T., Kamenetsky-Goldstein R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 23. Article 16777. doi: 10.3390/ijms242316777
35. Waadt R., Sella C.A., Hsu P.K., Takahashi Y., Munemasa S., Schroeder J.I. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 10. P. 680–694. doi: 10.1038/s41580-022-00479-6
36. Singh N., Kumaria S. // *Gene*. 2020. V. 762. Article 145104. doi: 10.1016/j.gene.2020.145104
37. Wang J., Zhang C., Li Y. // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 3. Article 410. doi: 10.3390/genes13030410
38. Lijuan C., Huiming G., Yi L., Hongmei C. // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. № 5. P. 885–894. doi: 10.1007/s00299-015-1751-7
39. Gu H., Wang Y., Xie H., Qiu C., Zhang S., Xiao J., Li H., Chen L., Li X., Ding Z. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. Article 15504. doi: 10.1038/s41598-020-72596-1
40. ElSayed A.I., El-Hamahmy M.A.M., Rafudeen M.S., Mohamed A.H., Omar A.A. // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8. № 12. Article 611. doi: 10.3390/plants8120611
41. Nopo-Olazabal C., Condori J., Nopo-Olazabal L., Medina-Bolivar F. // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 74. P. 50–69. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.035
42. Yang M., Wang L., Belwal T., Zhang X., Lu H., Chen C., Li L. // *Molecules*. 2019. V. 25. № 1. P. 12. doi: 10.3390/molecules25010012
43. Shang A., Cao S.Y., Xu X.Y., Gan R.Y., Tang G.Y., Corke H., Mavumengwana V., Li H.B. // *Foods*. 2019. V. 8. № 7. Article 246. doi: 10.3390/foods8070246
44. Deng Y., Li C., Li H., Lu S. // *Molecules*. 2018. V. 23. № 6. Article 1467. doi: 10.3390/molecules23061467
45. Ehmann B., Ocker B., Schafer E. // *Planta*. 1991. V. 183. P. 416–422. doi: 10.1007/BF00197741
46. Hartmann U., Sagasser M., Mehrstens F., Stracke R., Weisshaar B. // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. № 2. P. 155–171. doi: 10.1007/s11103-004-6910-0