

УДК 581.1.577.21:575.113.12

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГЕНА МОНОДЕГИДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗЫ У КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.) И ЕГО РОЛЬ В ОТВЕТЕ НА СТРЕССЫ¹

© 2024 г. М.А. Филюшин^{а,*}, Д.Х. Архестова^{а, б}, Е.З. Кочиева^а, А.В. Щенникова^а

^аИнститут биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, Россия

^бИнститут сельского хозяйства, Федеральный научный центр “Кабардино-Балкарский научный центр
Российской академии наук”, Нальчик, Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 15.06.2023 г.

Растения кукурузы *Zea mays* L. чувствительны ко многим стрессовым факторам, вызывающим избыточное образование активных форм кислорода, механизм нивелирования воздействия которых на организм включает фермент монодегидроаскорбатредуктазу (MDHAR; EC 1.6.5.4), катализирующий восстановление монодегидроаскорбиновой кислоты до аскорбата. В геноме кукурузы известно четыре гена *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*, различающихся внутриклеточной локализацией кодируемых белков MDHAR. В данной работе был идентифицирован новый ген семейства – *ZmMDHAR5* (*Zm00001d017786*; LOC100193942), кодирующий близкий структурный гомолог пероксисомального *ZmMDHAR3*. Сделано предположение, что *ZmMDHAR5* может иметь функции, близкие к хлоропласт-митохондриальным MDHAR. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в проростках кукурузы в ответ на различные стрессовые факторы позволила также предположить важное участие *ZmMDHAR4* и *ZmMDHAR5* в ответе на экзогенную абсцизовую кислоту, низкие температуры и обезвоживание; *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR3* – на солевой стресс; *ZmMDHAR2* – на избыток соли и дефицит воды.

Ключевые слова: *Zea mays*, MDHAR, дифференциальная экспрессия гена в ответ на стрессовые факторы

DOI: 10.31857/S0015330324010067, EDN: NWCVVE

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм кислорода у аэробных организмов, в том числе у растений, приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), избыток которых индуцирует повреждение, нарушение функций и гибель клеток за счет окисления нуклеиновых кислот, липидов, белков и полисахаридов [1]. У растений способность нивелировать эффекты АФК считается одним из наиболее важных факторов, определяющих устойчивость к различным стрессам, и первая линия защиты представлена антиоксидантами. Механизмы устранения эффектов АФК включают ферменты (например, супероксиддисмутазы, пероксидазы, глутатион-S-трансферазы, аскорбатпероксидазы и пр.), а также неферментные компоненты, такие как алкалоиды, флавоноиды, каротиноиды и др. Важнейшим компонен-

том антиоксидантной системы растения считается L-аскорбиновая кислота (АК, витамин С), которая связывается с АФК (супероксидом кислорода, перекисью водорода и радикалом токоферола), восстанавливая их [2, 3]. Под действием аскорбатпероксидаз и аскорбатоксидаз образуется промежуточная окисленная форма АК – L-монодегидроаскорбиновая кислота (MDHA), которая затем может перейти в другую окисленную форму – L-дегидроаскорбиновую кислоту (DHA) [3]. Восстановление MDHA и DHA до аскорбата катализируется ферментами монодегидроаскорбатредуктазой (MDHAR; EC 1.6.5.4) и дегидроаскорбатредуктазой (DHAR; EC 1.8.5.1) соответственно [3].

Монодегидроаскорбатредуктазы различаются по локализации в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и цитозоле, и кодирующие их гены идентифицированы и описаны у многих видов растений [4–6]. Различные абиотические и биотические стрессы оказывают су-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324010067

ственное влияние на уровни транскрипции генов *MDHAR* и активность кодируемых ферментов [1, 4, 7–10]. Например, в ответ на солевой стресс у лука репчатого (*Allium cepa* L.) выявлено увеличение активности MDHAR в симпласте корня и листа [11]. В ответ на заражение грибным патогеном *Puccinia striiformis* в растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) растет экспрессия гена *TaMDHAR4* [7]. Сверхэкспрессия гена *MDHAR* томата (*Solanum lycopersicum* L.) и мангрового дерева (*Acanthus ebracteatus*) повышает устойчивость к солевому стрессу у табака (*Nicotiana*) [12] и риса (*Oryza sativa* L.) [13] соответственно.

В геноме кукурузы (*Zea mays* L.) идентифицированы гены основных ферментов путей биосинтеза и рециклинга АК, в том числе четыре гена, кодирующие монодегидроаскорбатредуктазы различной клеточной локализации: *ZmMDHAR1* (GRMZM2G084881), *ZmMDHAR2* (GRMZM2G134708), *ZmMDHAR3* (GRMZM2G320307) и *ZmMDHAR4* (GRMZM5G828229) [14–17]. Показано, что белки MDHAR и DHAR вовлечены в поддержание количества АК в эндосперме зерна кукурузы в процессе созревания [15]. Кроме того, после заражения зерна грибами *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans* и *Aspergillus flavus* наблюдается значительное снижение ферментной активности MDHAR [8].

В данной работе был идентифицирован новый ген монодегидроаскорбатредуктазы кукурузы – *Zm00001d017786* (LOC100193942), являющийся гомологом гена *ZmMDHAR3*. Данный ген, *ZmMDHAR5*, был охарактеризован в сравнении с известными членами семейства *ZmMDHAR*, в том числе по ответу на экзогенное воздействие абсцизовой кислоты (АБК) и абиотические стрессовые факторы (низкую положительную температуру, водный дефицит и избыток соли) в листьях проростков кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов *MDHARs*. Поиск последовательностей генов монодегидроаскорбатредуктаз проводили в геноме кукурузы *Z. mays* (сорт В73) (сборка GCF_902167145.1). В качестве референсных последовательностей использовали мРНК генов семейства *MDHAR Arabidopsis thaliana* L. *AtMDHAR1* (AT3G52880.1), *AtMDHAR2* (AT5G03630), *AtMDHAR3* (AT3G09940), *AtMDHAR4* (AT3G27820), *AtMDHAR6* (AT1G63940).

Выравнивание и структурно-филогенетический анализ нуклеотидных и белковых последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для характеристики экзон-интронной структуры генов использовали данные NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Консервативные домены и мотивы белков 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. Поиск трансмембранных спиралей, транспортных и сигнальных пептидов и доменов связывания с кофакторами проводили на серверах TMHMM server 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), TargetP-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>) и Cofactory-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0>) соответственно. Молекулярный вес и изоэлектрическую точку (pI) белков рассчитывали с помощью ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), внутриклеточную локализацию предсказывали с помощью WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>).

Растительный материал, воздействие стрессовых факторов. В работе были использованы растения кукурузы сорта В73 (семена предоставлены Всероссийским институтом генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова). Растения выращивали в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м² с)) в течение 30 дней до стадии 3–4 листьев.

Полученные растения использовали для анализа реакции на стресс. Обработку холодом проводили при температуре 3°C в климатической камере (остальные условия выращивания прежние; контроль – необработанные растения). Воздействие АБК осуществляли опрыскиванием опытных растений водным 100 мкМ раствором АБК согласно [18, 19] (контроль – растения, опрысканные водой). Для анализа влияния водного дефицита и избытка соли опытные и контрольные растения извлекали из почвы, корни отмывали дистиллированной водой и переносили на жидкие МС-среды, содержащие (в случае опытных растений) 10% полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000; дефицит воды) или 250 мМ NaCl (избыток соли) соответственно.

Листья собирали через 6 и 24 ч после каждой обработки (контроль и опыт) и замораживали (–80°C) до дальнейшего анализа. Опыты проводили в двух биологических и трех технических повторях. Собранный растительный материал измельчали растиранием в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; “QIAGEN”, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, “Promega”, США). Концентрации РНК и кДНК определяли количественно с помощью флуо-

риметрии (Qubit Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США).

Определение профиля экспрессии генов MDHAR. Профиль экспрессии генов семейства MDHAR определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов MDHAR были разработаны специфичные праймеры (Дополнительные материалы, табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов MDHAR оценивали, используя референсный ген *polyubiquitin* (GRMZM2G419891). Для ПЦР-РВ использовали 3 нг кДНК, набор “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ 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

Ранее в геноме кукурузы было идентифицировано четыре гена монодегидроаскорбатредуктаз, локализованные на хромосомах 2, 4, 5 и 10 [14]. В результате поиска в геноме кукурузы В73 (GCF_902167145.1) на хромосоме 5 был найден новый, не охарактеризованный ген семейства MDHAR – *Zm00001d017786* (LOC100193942), получивший название *ZmMDHAR5* (табл. 1). Ген *ZmMDHAR5* размером 2437 п.н. включает 7 экзонов, составляющих 1506 нуклеотидов кодирующей последовательности, что соответству-

ет белку длиной 501 а.о. Ближайшим гомологом *ZmMDHAR5* является белок *ZmMDHAR3* (идентичность последовательностей 66%), тогда как степень идентичности с остальными белками семейства *ZmMDHAR* составила 51% (*ZmMDHAR1*), 53% (*ZmMDHAR2*) и 43% (*ZmMDHAR4*).

Было обнаружено, что ген *ZmMDHAR5* локализован в непосредственной близости от гена *ZmMDHAR3*, и расстояние от последнего экзона *ZmMDHAR3* до первого экзона *ZmMDHAR5* составляет 849 п.н. (в геноме сорта В73). Структура фрагмента хромосомы 5, включающего оба гена и спейсер между ними, была проанализирована в геномах 35 генотипов кукурузы, включая 33 образца *Z. mays* ssp. *mays*, а также образцы дикой кукурузы (*Z. mays* ssp. *mexicana* и *Z. mays* ssp. *parviglumis*), доступные в NCBI. В результате, исходя из структуры анализируемого фрагмента, образцы были разделены на четыре группы (табл. 2, рис. 1). Вариант 1, куда вошел сорт В73, оказался наиболее часто встречающимся (15 образцов) и соответствовал наименьшей длине фрагмента и межгенного спейсера. Вариант 2, где фрагмент был почти в два раза длиннее варианта 1 за счет увеличения (в ~7.5 раз) интрона 1 гена *ZmMDHAR3*, был найден у двух образцов. Вариант 3 (10 образцов) превышал вариант 1 в ~3.5 раза в связи с удлинением межгенного спейсера (в ~19 раз). Вариант 4 (8 образцов) был еще протяженнее варианта 1 (в ~4 раза) вследствие увеличения последнего интрона *ZmMDHAR3* и межгенного спейсера (табл. 2, рис. 1).

Аминокислотная последовательность *ZmMDHAR5* содержала, как и остальные белки *ZmMDHAR*, каталитический домен Puf_redox_2 (pfam07992) (рис. 2), специфичный для семейства пиридиннуклеотиддисульфидокси-

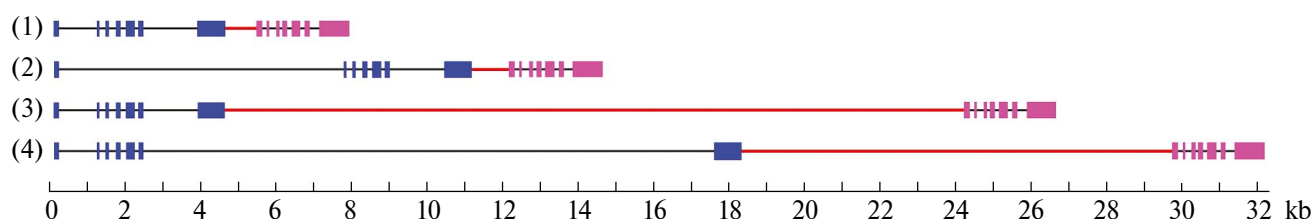
Таблица 1. Структурная характеристика семейства ZmMDHAR кукурузы (сорт В73)

Ген*	NCBI Gene ID	Локализация в геноме	Ген, п.н.	Количество экзонов	кДНК, нукл	Белок, а.о.	MW, kDa	pI
<i>ZmMDHAR1</i>	LOC100501585/ GRMZM2G084881	chr2: 170092027..170096426	4400	10	1308	435	46.7	5.45
<i>ZmMDHAR2</i>	LOC100382120/ GRMZM2G134708	chr4: 55570443..55574412	3970	9	1302	433	46.5	5.60
<i>ZmMDHAR3</i>	LOC100279805/ GRMZM2G320307	chr5: 209360354..209364879	4526	7	1437	478	51.9	8.54
<i>ZmMDHAR4</i>	LOC100272772/ GRMZM5G828229	chr10: 83203457..83207657	4201	17	1500	499	53.8	8.66
<i>ZmMDHAR5</i>	LOC100193942/ Zm00001d017786	chr5: 209357068..209359504	2437	7	1506	501	53.7	7.66

Примечание: * – названия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* даны в соответствии с [14].

Таблица 2. Размеры последовательностей генов *ZmMDHAR3*, *ZmMDHAR5* и спейсера между ними в геноме 35 образцов кукурузы из базы данных NCBI

	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Образцы кукурузы (NCBI)	B73, PH207, B104, И14Н, F7, EP1, OH7B, RP125, Mo18W, K0326Y, PHJ40, Mo17, B84, W22, ssp. <i>mexicana</i>	NC358, CIMBL55	CML247, KI3, OH43, TZ18, DK105, PE0075, Ia453-sh2, A188, CML277, Zm00056a	CML333, Ky21, CML69, LH145, CML228, CML103, CML52, ssp. <i>parviglumis</i>
Фрагмент хромосомы <i>ZmMDHAR3</i> – <i>ZmMDHAR5</i> , п.н.	7772–8104	14511–14514	26552–26582	32072–32375
Ген <i>ZmMDHAR3</i> , п.н.	4473–4526	11067–11071	4527–4528	18208–18512
Межгенный спейсер, п.н.	849–1195	993	19589–19616	11419–11437
Ген <i>ZmMDHAR5</i> , п.н.	2351–2466	2450–2451	2436–2438	2430–2437

**Рис. 1.** Варианты (1–4) фрагмента *ZmMDHAR3*–*ZmMDHAR5* на хромосоме 5 в геноме 35 образцов кукурузы, включая экзон-интронную структуру генов *ZmMDHAR3* (экзоны обозначены синими блоками) и *ZmMDHAR5* (экзоны обозначены розовыми блоками); красной линией обозначен межгенный спейсер.

доредуктаз и включающий сайты связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H [9]. Анализ последовательностей белков *ZmMDHAR* в программе Cofactory-1.0 идентифицировал по два сайта связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H у каждого из пяти белков (рис. 2). При этом оба сайта содержали консенсус GxGxxG/GxGxxxG (рис. 2), характерный для FAD/NAD(P)H-связывающих доменов [20].

С целью определения внутриклеточной локализации белков *ZmMDHAR* был проведен анализ возможного присутствия в их последовательности трансмембранных α -спиралей, митохондриального и хлоропластного транспортных пептидов или мотивов, характерных для специфичной локализации монодегидроаскорбатредуктаз. В результате было предсказано, что *ZmMDHAR4* содержит на N-конце митохондриальный транспортный пептид (1–49 а.о.; вероятность 0.81), однако вероятность присутствия хлоропластного транспортного пептида очень низка (0.18). Белки *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* могут формировать две трансмембранные спирали в положениях 5-24/450-

472 а.о. и 5-24/467-489 а.о. соответственно. На C-конце *ZmMDHAR3* был обнаружен консервативный мотив WYGRKRRRW, характерный для пероксисомальных монодегидроаскорбатредуктаз [9]. Удлиненный вариант данного мотива (WYGWKAPYLAKRHF) присутствует также на C-конце *ZmMDHAR5*, однако не содержит при этом RK-обогащенного консенсуса (рис. 2). Ближайшие гомологи *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* – белки риса *OsMDHAR2* и *OsMDHAR1* соответственно, достоверно формируют только одну (С-терминальную) трансмембранную α -спираль и WYG-мотивы, сходные с мотивами своих ближайших гомологов.

На основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей MDHAR кукурузы, риса (*O. sativa*), спаржи (*Asparagus officinalis*), чеснока (*Allium sativum* L.) и модельного двудольного вида (*A. thaliana*) была построена дендрограмма (рис. 3). Согласно полученным данным, белки *ZmMDHAR* кластеризуются с соответствующими ортологами с четким разделением на клады (1), (2) и (3), которые объединяют цитозольные, пероксисомальные и

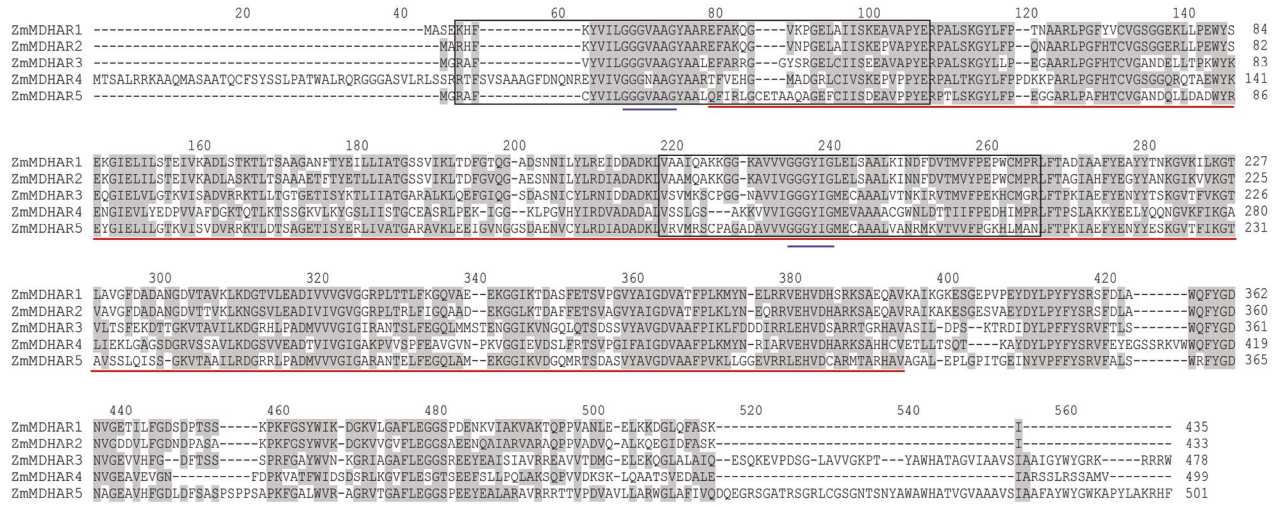


Рис. 2. Вываривание последовательностей белков семейства ZmMDHAR. Домен Puf_redox_2 (pfam07992) подчеркнут красным. Черными рамками выделены сайты связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H. Синим подчеркнут консенсус GxGxxG/GxGxxxG.

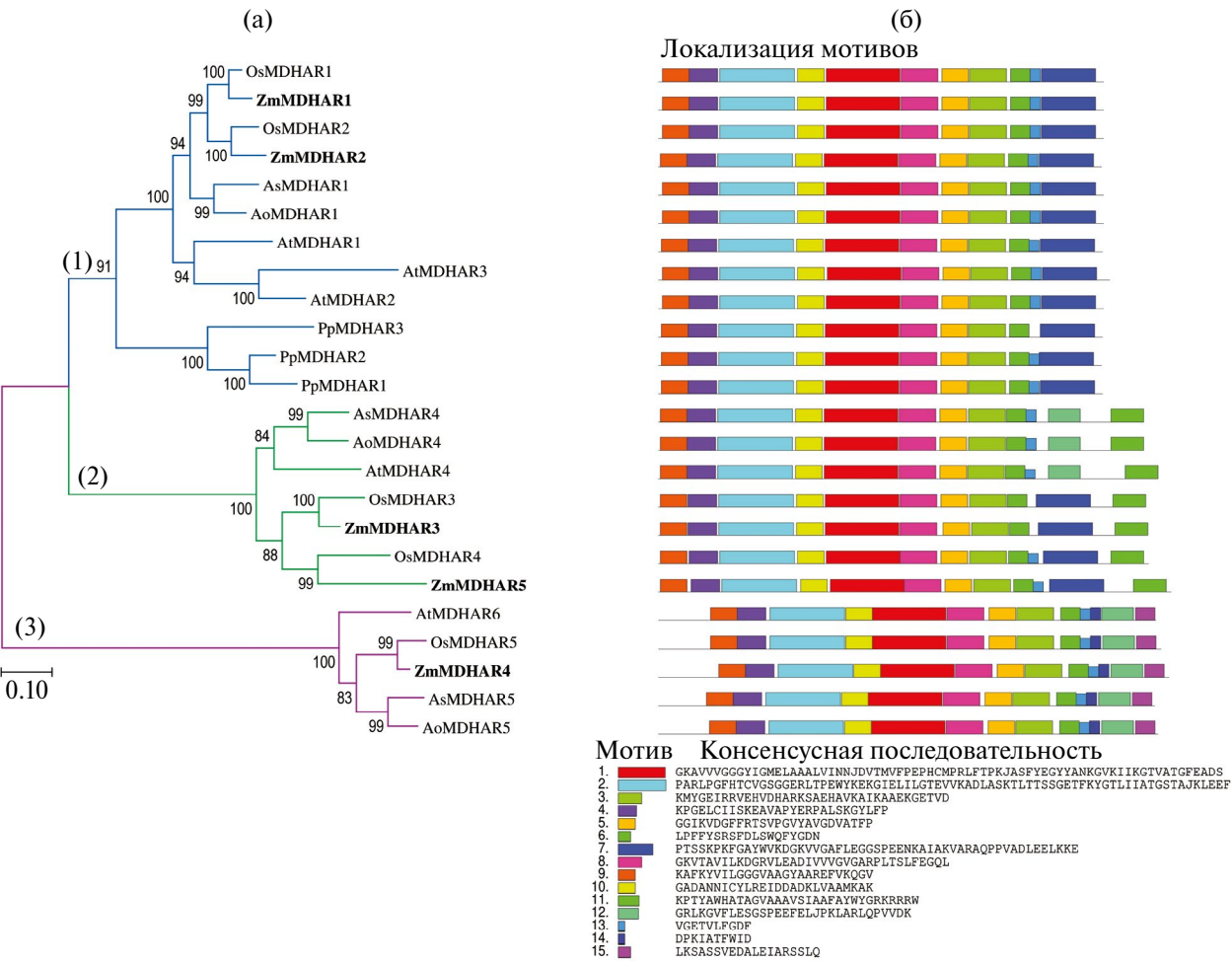


Рис. 3. а – Филогенетическое дерево на основе последовательностей белков MDHARs риса *O. sativa* (OsMDHAR1 (NP_001404045.1), OsMDHAR2 (NP_001403773.1), OsMDHAR3 (XP_015611766.1), OsMDHAR4 (NP_001390619.1), OsMDHAR5 (XP_015649952.1)), спаржи *As. officinalis* (AoMDHAR1 (XP_020260315.1), AoMDHAR4 (XP_020251572.1), AoMDHAR5 (XP_020241046.1)), чеснока *A. sativum* (AsMDHAR1 (Asa7G02482.1), AsMDHAR4 (Asa0G05211.1), AsMDHAR5 (Asa5G00445.1)), *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-реплик). б – Идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках MDHAR.

хлоропластные/митохондриальные MDHAR соответственно (рис. 3а). Белок ZmMDHAR5 ожидаемо вошел в кладу (2) вместе со своим ближайшим гомологом ZmMDHAR3 (рис. 3а).

Результаты анализа тех же аминокислотных последовательностей в программе MEME 5.1.1 подтвердили разделение белков MDHAR на дендрограмме. Всего было идентифицировано 15 консервативных мотивов, состав и расположение которых было специфичным в каждой из трех клад (рис. 3б). Десять мотивов (в порядке 9-4-2-10-1-8-5-3-6-13 от N- к С-концу) были общими (за редким исключением) для всех типов монодегидроаскорбатредуктаз. Мотив 7 специфично присутствовал у всех цитозольных белков клад (1), а также у пероксисомальных MDHAR клад (2), относящихся к образцам семейства Злаковые (рис. 3б). Белки другой части клад (2) и пластидные MDHAR клад (3) отличались от остальных наличием мотива 12 (рис. 3б). С-концевые мотивы 14 и 15 были обнаружены только у белков клад (3) (рис. 3б). Наконец, С-концевой мотив 11 оказался специфичным для пероксисомальных MDHAR клад (2) (рис. 3б) и включал в себя консенсус WYGRKRRRW/WYGWKAPYLAKRHF, специфичный для данного типа монодегидроаскорбатредуктаз [9].

С целью определить, участвуют ли гены *ZmMDHAR* в ответе на стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскрипции данных генов в листьях проростков кукурузы при воздействии экзогенной АБК, а также в ответ на стрессы (холод, избыток соли и водный дефицит) (рис. 4). В результате было показано, что экспрессия гена *ZmMDHAR1* снижается в ответ на АБК, холод и обезвоживание, тогда как при избытке соли уровень транскриптов *ZmMDHAR1* сначала растет (в 1.7 раза через 6 ч воздействия), но затем (через 24 ч) падает почти до контрольного значения.

В сравнении с контролем, уровень транскриптов гена *ZmMDHAR2* возрастал в ответ на солевой стресс (в 3.2 раза через 6 ч и в 5.7 раз че-

рез 24 ч) и водный дефицит (в 1.8 и 3.9 раз через 6 и 24 ч соответственно) (рис. 4). При воздействии АБК экспрессия *ZmMDHAR2* сначала усиливалась в 1.1 раза (6 ч), а через 24 ч ослабевала в 2.4 раза (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR3* в ответ на АБК и водный дефицит последовательно (6–24 ч) снижалась, тогда как холодное воздействие привело сначала (6 ч) к падению уровня транскриптов в 2.1 раза, а затем (24 ч) — к его восстановлению до уровня контроля. В ответ на солевой стресс экспрессия *ZmMDHAR3* повышалась в 1.5 раза (6 ч), а через 24 ч снижалась в 1.5 раза по отношению к контролю (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR4* через 6 ч в ответ на АБК, избыток соли и обезвоживание поднималась в 1.4, 1.8 и 1.3 раза соответственно, а через 24 ч снижалась до уровня ниже контрольного. В ответ на холод количество мРНК *ZmMDHAR4* сначала уменьшалось (6 ч), а затем (24 ч) увеличивалось в 3 раза в сравнении с контролем (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR5* в ответ на АБК и холод снижалась в 1.2 раза через 6 ч и поднималась в 5.3 раза через 24 ч. При солевом стрессе происходило последовательное уменьшение уровня транскриптов гена (6–24 ч), тогда как в условиях водного дефицита наблюдался первоначальный (6 ч) рост уровня транскриптов в 2.4 раза с последующим (24 ч) его падением в 1.8 раза в сравнении с контролем (рис. 4).

Таким образом, все пять генов *ZmMDHAR* характеризовались индивидуальным экспрессионным ответом на стрессовые факторы, в том числе и гены, относящиеся к одной кладе. К примеру, *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2* клады (1) сходным образом реагировали только на холод, тогда как ответ генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* клады (2) был строго ген-специфичным. Наибольший рост уровня транскриптов отмечался для *ZmMDHAR2* в ответ на соль и водный дефицит, *ZmMDHAR4* — в ответ на холод и *ZmMDHAR5* — в ответ на холод и обезвоживание.

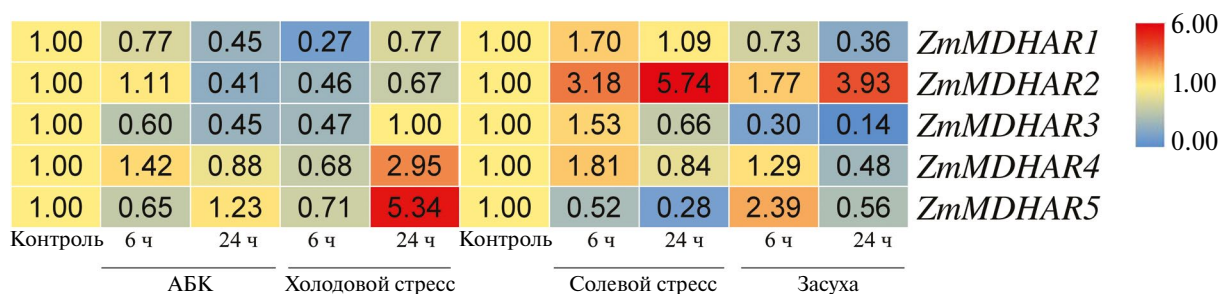


Рис. 4. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR* в ответ на обработку АБК (100 мкМ), холодовой стресс (+3°C), солевой стресс (NaCl, 250 мМ) и обезвоживание (10% ПЭГ-6000) в течение 6 и 24 ч. Необработанный контроль принят за 1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кукуруза (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae) как одолетняя травянистая яровая злаковая культура с высокой экономической ценностью представляет собой результат доместикации дикорастущего предка (теосинте *Zea mays* ssp. *parviglumis*) в центральной долине реки Бальсас на юго-западе Мексики (субтропики) около 9000 лет назад [21]. Климат в центре происхождения способствовал высокой чувствительности кукурузы к основным стрессам, с которыми данная культура сталкивалась и продолжает сталкиваться при распространении по миру.

Современная кукуруза в значительной степени чувствительна к холоду [22], засухе [23], избытку соли [24] и грибным инфекциям [25], которые, провоцируя окислительный стресс, значительно снижают урожайность культуры. При этом изменяется экспрессия генов метаболизма аскорбата, в том числе генов *MDHAR*, и активность кодируемых ими ферментов, включая монодегидроаскорбатредуктазы. Так, избыток соли вызывает деструктивные изменения в хлоропластах кукурузы за счет светозависимого окислительного стресса, что сопровождается ростом ферментной активности *MDHAR* [24]. К водному дефициту кукуруза особенно восприимчива на стадии всходов, при этом ферментная активность *MDHAR* в условиях стресса снижается [23]. Повышенная чувствительность кукурузы к холоду наблюдается во время прорастания семян и фазы всходов, когда нарушается проницаемость клеточных мембран и происходит, в числе прочего, накопление высоких уровней АФК в растительных клетках [22]. Восприимчивость кукурузы к грибным патогенам продемонстрирована на примере инфекций *Fusarium* sp. [25]. Заражение растения грибами способствует накоплению в тканях микотоксинов, в ответ на которые изменяется ферментная активность *MDHAR* [8, 26, 27]. Важность для кукурузы восстановленных форм аскорбата как антиоксидантов подчеркивается тем, что даже при воздействии гербицида никосульфурона, используемого для борьбы с сорняками на кукурузных полях, растут уровни транскриптов *MDHAR* [28].

К настоящему времени в геноме кукурузы аннотировано четыре гена *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*, кодирующие монодегидроаскорбатредуктазы [14, 16]. В данной работе нами был идентифицирован пятый ген семейства — *Zm00001d017786* (LOC100193942), локализованный на хромосоме 5 в tandemном кластере с известным геном *ZmMDHAR3*. Ген получил название *ZmMDHAR5* и был охарактеризован нами в сравнении с другими генами семейства (*ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*).

Тандемное расположение генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5*, высокий уровень гомологии аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков (66%), а также совместная кластеризация на дендрограмме (рис. 3а) позволяет предполагать, что данные гены произошли в результате тандемной дупликации и *ZmMDHAR5* может выполнять сходные с *ZmMDHAR3* функции. О функции *ZmMDHAR3* известно немного. Уровень экспрессии гена повышается в ответ на атаку двух видов тли (*Rhopalosiphum padi* L., *Sitobion avenae* F.) [16], что допускает участие *ZmMDHAR5* в реакции на биотические стрессовые факторы.

Среди ближайших гомологов *ZmMDHAR5* также отмечены два гена *O. sativa* — *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* (рис. 3а), последний из которых детально охарактеризован в работе [19] под названием *OsMDHAR4* (далее по тексту *OsMDHAR2*). Транскрипты гена *OsMDHAR2* присутствуют во всех органах (с максимумом в листе), и их уровень изменяется в разной степени в ответ на воздействие экстремальных температур, засухи, избытка соли, H_2O_2 и АБК [19]. Мутация *osmdhar2* способствует закрытию устьиц, накоплению перекиси водорода и повышению устойчивости растений риса к тепловому стрессу; сверхэкспрессия *OsMDHAR2* ожидаемо оказывает противоположный эффект [19].

Клада (2), куда входит кластер белков *ZmMDHAR3*, *ZmMDHAR5*, *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* (рис. 3а), объединяет пероксисомальные ферменты, если исходить из известной локализации кладообразующего *MDHAR4 A. thaliana* [29]. Однако белок *OsMDHAR2* локализуется в хлоропластах, согласно результатам анализа локализации *OsMDHAR2*, сшитого с последовательностью желтого флуоресцентного белка (YFP), при транзientной экспрессии в эпидермальных клетках *Nicotiana benthamiana* L. [19].

Подтверждением пероксисомальной локализации *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* может служить формирование ими двух трансмембранных α -спиралей, характерных для пероксисомальных *MDHAR*. Интересно, что их гомологи *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* с высокой достоверностью формируют только С-терминальную α -спираль, в то время как образование второй, N-терминальной α -спирали имеет низкую достоверность. Другой отличительный признак пероксисомальных *MDHAR*, консенсус R(K/R)RRR [29], присутствует на С-конце последовательностей *ZmMDHAR3* и *OsMDHAR2*, однако отсутствует у *ZmMDHAR5* и *OsMDHAR1*. Поэтому, несмотря на значимость RK-богатых последовательностей для экспорта белка в клеточные компартменты [30,31], связь консенсуса R(K/R)RRR с транспортом *MDHAR* в пероксисомы яв-

ляется спорной. Показанная хлоропластная локализация OsMDHAR2 [19] сочетается с отсутствием у него хлоропластного транспортного пептида, которого нет и у остальных трех белков.

Исходя из вышесказанного, в том числе противоречивых структурных и литературных данных, можно предположить, что ген *ZmMDHAR5* экспрессируется во всех органах растения с максимумом в листе; продукт гена — фермент *ZmMDHAR5*, участвует в ответах на стрессовые факторы, как биотические, так и абиотические, при этом его локализация внутри клетки требует дополнительных исследований.

Считается, что самое древнее происхождение среди белков семейства MDHAR имеют цитозольные ферменты (клада (1) на рис. 3а), так как все *PpMDHAR* мха *Physcomitrella patens* гомологичны (включая экзон-интронную структуру генов *PpMDHAR*) цитозольным MDHAR высших растений и лишены N-/C-концевых сигналов локализации белков MDHAR в оргanelлах [32]. Участие генов *PpMDHAR* в стрессовых ответах предполагает связь адаптационной эволюции наземных растений с эволюцией цитозольных MDHAR, которые стали предшественниками мембран-связываемых пероксисомальных и затем хлоропласт-митохондриальных MDHAR [32]. Таким образом, гены *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* могут иметь недавнее происхождение относительно *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2*, и предшествовать появлению *ZmMDHAR4*.

Структурные особенности белка *ZmMDHAR5*, вхождение в кладу (2) (рис. 3а) и гомология с OsMDHAR2 позволяют допустить как пероксисомальную, так и хлоропластную локализацию *ZmMDHAR5* как возможной переходной формы между пероксисомальными и хлоропласт-митохондриальными MDHAR кукурузы. Подобный статус, к примеру, имеет белок *A. thaliana* AtMDHAR1, входящий в кладу (1) цитозольных MDHAR (рис. 3а), однако по локализации относящийся скорее к пероксисомальным белкам [29] и являющийся возможной переходной формой между цитозольными и пероксисомальными MDHAR.

Учитывая изменения ферментной активности MDHAR в ответ на абиотические и биотические стрессы у кукурузы [16, 23, 24, 26, 28], а также дифференциальную экспрессию генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* в ответ на атаку тли [16], все гены *ZmMDHAR*, включая *ZmMDHAR5*, могут участвовать в стрессовом ответе. С целью проверки данного предположения был проведен анализ уровней транскриптов генов *ZmMDHAR1–5* в листьях проростков кукурузы при опрыскивании водным раствором АБК, а также в ответ на абиотические стрессовые факторы (холод, избыток соли и водный дефицит). АБК была использована нами, поскольку данный фитогормон не

только играет одну из доминирующих ролей в ответе на абиотические стрессы [22], но и участвует в ответе на биотические стрессы, оказывая разнонаправленное влияние на защитные реакции растения в зависимости от его взаимодействия с патогенами [33].

Показанный в результате индивидуальный для каждого из пяти генов *ZmMDHAR* ответ на стрессовые факторы (рис. 4), вероятно, связан со специфичностью/локализацией *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в сочетании с особенностями воздействия конкретного стресса на растительную клетку. Несмотря на структурную гомологию и, возможно, общее происхождение генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5*, их ответ на все четыре вида воздействия значительно различался (рис. 4), что может служить косвенной поддержкой предположения о переходном статусе *ZmMDHAR5*. В пользу этого говорит также сходство профиля изменения экспрессии гена *ZmMDHAR5* с профилем гена *ZmMDHAR4* (хлоропласт-митохондриальная клада, рис. 4) в условиях низкой температуры и водного дефицита, деструктивно влияющих на хлоропласты [22, 23].

Уникальность роли *ZmMDHAR5* в нивелировании последствий как абиотических, так и биотических стрессов у кукурузы подчеркивается увеличением уровня его транскриптов через 24 ч после обработки АБК, в то время как экспрессия остальных *ZmMDHAR* резко снижалась (рис. 4). Более того, значительный (в 5.3 раза) рост экспрессии *ZmMDHAR5* спустя сутки пребывания растения на холоде (рис. 4) говорит о важной роли гена в определении устойчивости кукурузы к низким температурам. Ранний (6 ч) высокий ответ *ZmMDHAR5* на обработку ПЭГ (рис. 4) указывает на участие гена в регуляции устойчивости растения к нехватке воды на начальных этапах засушливого периода. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* в ответ на стрессы предполагает важность активации *ZmMDHAR4* в условиях низкой температуры и избытка соли, а также *ZmMDHAR2* при избытке соли и нехватке воды.

В целом, только при воздействии низкой температуры экспрессия всех пяти генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* изменялась сходным образом — снижалась при раннем ответе и поднималась спустя сутки воздействия. Резкое снижение экспрессии относящихся к цитозольной группе генов *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2*, отмеченное при раннем (6 ч) ответе на холод (рис. 4), согласуется с подобной реакцией гомологичного им гена риса *OsMDHAR3* (в статье ген назван *OsMDHAR1*) при витрификации побегов [34].

При влиянии других трех факторов наблюдалась значительная изменчивость реакции генов, в том числе во времени (рис. 4). Это может быть связано с типом воздействия фактора в случае каждого конкретного клеточного компартмен-

та и, как следствие, с локализацией и функциональными особенностями рассматриваемых ферментов.

С учетом функции MDHAR, заключающейся в восстановлении МДНА до аскорбата [3], можно предположить, что ответное действие генов *ZmMDHAR* направлено на поддержание концентрации аскорбата как антиоксиданта на уровне, необходимом для устранения воздействия растущих при стрессе количеств АФК. При этом следует отметить, что аскорбат не является единственным и главным антиоксидантом. К примеру, при обезвоживании его количество в различных компартментах клетки поддерживается на постоянном уровне до очень поздних стадий засухи [35]. В то же время падает содержание другого важного антиоксиданта – глутатиона [35].

Более того, разные компартменты клетки могут быть по-разному вовлечены в поддержание аскорбата на нужном уровне. К примеру, витамин С в растении синтезируется в цитозоле, за исключением конечной стадии синтеза, которая осуществляется в межмембранном пространстве митохондрий, после чего аскорбат может транслоцироваться в цитозоль и хлоропласты [36].

Также необходимо учитывать, что MDHAR – это только один из группы ферментов синтеза-рециклинга аскорбата в растении [36]. Поэтому значительная изменчивость реакции генов *ZmMDHAR* на изучаемые факторы может свидетельствовать о различиях в степени их привлечения в совместную с другими ферментами деятельность по поддержанию нужного клетке количества аскорбата как в нормальных условиях, так и при стрессовых воздействиях.

Таким образом, в данной работе был идентифицирован новый ген семейства MDHAR – *ZmMDHAR5*, который кодирует гомолог пероксисомального фермента *ZmMDHAR3*, однако может иметь функции, близкие к хлоропласт-митохондриальным белкам MDHAR. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в проростках кукурузы при различных стрессах предполагает важное участие *ZmMDHAR5* и *ZmMDHAR4* в ответе на АБК, холод и водный дефицит; *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR3* – в раннем ответе на солевой стресс; *ZmMDHAR2* – в устойчивости кукурузы к избытку соли и нехватке воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 21-16-00008; Идентификация и характеристика нового гена *ZmMDHAR5*) и Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства Российской Федерации (“Аграрная наука – шаг в будущее развитие АПК”; характеристика стрессового ответа генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and anti-oxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
2. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405.
3. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 22. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
4. Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 2111. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066225>
5. Sano S., Tao S., Endo Y., Inaba T., Hossain M.A., Miyake C., Matsuo M., Aoki H., Asada K., Saito K. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. V. 69. P. 762.
6. Zhou F., Zheng B., Wang F., Cao A., Xie S., Chen X., Schick J.A., Jin X., Li H. Genome-Wide Analysis of MDHAR gene family in four cotton species provides insights into fiber development via regulating AsA redox homeostasis // Plants. 2021. V. 10. Article 227. <https://doi.org/10.3390/plants10020227>
7. Feng H., Liu W., Zhang Q., Wang X., Wang X., Duan X., Li F., Huang L., Kang Z. 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.015>
8. Lanubile A., Maschietto V., De Leonardis S., Battilani P., Paciolla C., Marocco A. 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. P. 546. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0269-R>
9. Negi B., Salvi P., Bhatt D., Majee M., Arora S. 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>
10. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. 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.
<https://doi.org/10.3390/molecules201119741>
11. *García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P., García M., Hernández J.A.* The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress // *Antioxidants*. 2020. V. 12. Article 67.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010067>
 12. *Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L., Kunzhi L., Huini X., Xudong S.* 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>
 13. *Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M., Namasivayam P., Napis S., Ho C.L.* Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice // *J. Plant Physiol*. 2012. V. 169. P. 311.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.004>
 14. *Liu Y.J., Yuan Y., Liu Y.Y., Liu Y., Fu J.J., Zheng J., Wang G.Y.* Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses // *J. Plant Physiol*. 2012. V. 169. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.08.018>
 15. *Sanahuja G., Farré G., Bassie L., Zhu C., Christou P., Capell T.* Ascorbic acid synthesis and metabolism in maize are subject to complex and genotype-dependent feedback regulation during endosperm development // *Biotechnol. J*. 2013. V. 8. P. 1221.
<https://doi.org/10.1002/biot.201300064>
 16. *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>
 17. *Hu X., Liu J., Li W., Wen T., Li T., Guo X., Liu R.H.* Biosynthesis and accumulation of multi-vitamins in black sweet corn (*Zea mays* L.) during kernel development // *J. Sci. Food Agric*. 2020. V. 100. P. 5230.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10573>
 18. *Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* *Zm-DREB2.9* gene in maize (*Zea mays* L.): genome-wide identification, characterization, expression, and stress response // *Plants*. 2022. V. 11. P.3060.
<https://doi.org/10.3390/plants11223060>
 19. *Liu J., Sun X., Xu F., Zhang Y., Zhang Q., Miao R., Zhang J., Liang J., Xu W.* Suppression of *OsMDHAR4* enhances heat tolerance by mediating H₂O₂-induced stomatal closure in rice plants // *Rice*. 2018. V. 11. Article 38.
<https://doi.org/10.1186/s12284-018-0230-5>
 20. *Yoon H.S., Lee H., Lee I.A., Kim K.Y., Jo J.* 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.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.05.013>
 21. *Chen Q., Li W., Tan L., Tian F.* Harnessing knowledge from maize and rice domestication for new crop breeding // *Mol. Plant*. 2021. V. 14. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.006>
 22. *Zhou X., Muhammad I., Lan H., Xia C.* Recent advances in the analysis of cold tolerance in maize // *Front Plant Sci*. 2022. V. 13. Article 866034.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.866034>
 23. *Xie T., Gu W., Zhang L., Li L., Qu D., Li C., Meng Y., Li J., Wei S., Li W.* Modulating the antioxidant system by exogenous 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethylamine in maize seedlings exposed to polyethylene glycol-simulated drought stress // *PLoS One*. 2018. V. 13. Article e0203626.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203626>
 24. *Omoto E., Nagao H., Taniguchi M., Miyake H.* Localization of reactive oxygen species and change of antioxidant capacities in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize under salinity // *Physiol. Plant*. 2013. V. 149. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/pp1.12017>
 25. *Bryła M., Pierzgański A., Zapaśnik A., Uwineza P.A., Ksieniewicz-Woźniak E., Modrzewska M., Waśkiewicz A.* Recent research on *Fusarium* mycotoxins in maize—a review // *Foods*. 2022. V. 11. Article 3465.
<https://doi.org/10.3390/foods11213465>
 26. *Ismaiel A.A., Papenbrock J.* Effect of patulin from *Penicillium vulpinum* on the activity of glutathione-S-transferase and selected antioxidative enzymes in maize // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017. V. 14. Article 825.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14070825>
 27. *Shabeer S., Asad S., Jamal A., Ali A.* Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review // *Toxins*. 2022. V. 14. Article 307.
<https://doi.org/10.3390/toxins14050307>
 28. *Wang J., Zhong X., Zhu K., Lv J., Lv X., Li F., Shi Z.* Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, and gene expression patterns in a pair of nearly isogenic lines of nicosulfuron-exposed waxy maize (*Zea mays* L.) // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2018. V. 25. P. 19012.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2105-0>
 29. *Lisenbee C.S., Lingard M.J., Trelease R.N.* Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase // *Plant J*. 2005. V. 43. P. 900.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.02503.x>
 30. *Hu B., Zeng W.P., Li X., Al-Sheikh U., Chen S.Y., Ding J.* A conserved arginine/lysine-based motif promotes ER export of KCNE1 and KCNE2 to regulate KCNQ1 channel activity // *Channels*. 2019. V. 13. P. 483.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1685626>
 31. *Kano T., Kouzuki T., Mizuno S., Ueda S., Yamano M., Sakane F., Saito N., Shirai Y.* Both the C1 domain and a basic amino acid cluster at the C-terminus are important for the neurite and branch induction ability of DGKβ // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014. V. 447. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.113>

32. Lunde C., Baumann U., Shirley N.J., Drew D.P., Fincher G.B. 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.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
33. De Vleeschauwer D., Xu J., Höfte M. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. Article 611.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00611>
34. Huang B., Zhang J.M., Chen X.L., Xin X., Yin G.K., He J.J., Lu X.X., Zhou Y.C. Oxidative damage and antioxidant indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification-cryopreservation procedure // Plant Cell Rep. 2018. V. 37. P. 1325.
<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2315-4>
35. Koffler B.E., Luschin-Ebengreuth N., Stabentheiner E., Müller M., Zechmann B. Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis* // Plant Sci. 2014. V. 227. P. 133.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.08.002>
36. Fenech M., Amaya I., Valpuesta V., Botella M.A. Vitamin C content in fruits: biosynthesis and regulation // Front. Plant Sci. 2019. V. 9. Article 2006.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02006>