ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 7, с. 755–771

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.21:575.113.12

ГЕНЫ ФЛАВИНСОДЕРЖАЩИХ МОНООКСИГЕНАЗ (*FMO*) ЧЕСНОКА *Allium sativum* L.: ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ГЕНОМЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ *Fusarium proliferatum*

© 2023 г. О. К. Анисимова[1], А. В. Щенникова[1], Е. З. Кочиева[1], М. А. Филюшин[1, *]

[1]*Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия*

**e-mail: michel7753@mail.ru*

Поступила в редакцию 11.01.2023 г.
После доработки 13.02.2023 г.
Принята к публикации 21.02.2023 г.

В настоящей работе в геноме чеснока *Allium sativum* L. идентифицировано 39 генов флавинсодержащих монооксигеназ. Показано разделение AsFMOs на три филогенетические клады, ассоциированные с N-оксигенированием (22 белка), биосинтезом ауксинов (13 белков) и S-оксигенированием (4 белка). В аминокислотных последовательностях AsFMOs найдены мотивы связывания с FAD и NADPH, FMO-идентифицирующий мотив и FATGY-мотив. Показано, что транскрипты *AsFMO*s присутствуют во всех органах чеснока с максимумом в корнях, листьях, цветоносе и воздушных луковицах. В ответ на заражение патогенным грибом *Fusarium proliferatum* выявлена дифференциальная экспрессия генов клады I (*AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35*) в корнях чеснока сортов Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили. При этом экспрессионный ответ гена *AsFMO18* клады III, вовлеченного в биосинтез аллиина, идентичен для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу. Это предполагает совместное участие генов клад I и III в ответных реакциях растений на заражение патогенами. Проанализирована кодирующая и регуляторная последовательности гена *AsFMO35* у сортов Стрелец и Сармат. Показано, что промоторная область гена *AsFMO35* отличается присутствием АБК-ассоциированного *цис*-регуляторного элемента ABRE у сорта Стрелец, восприимчивого к фузариозной гнили.

Ключевые слова: чеснок, *Allium sativum* L., флавинсодержащие монооксигеназы, фузариозная гниль, анализ экспрессии.

DOI: 10.31857/S0016675823070020, **EDN:** QISHHL

Флавинсодержащие монооксигеназы (FMO; EC 1.14.13.8) катализируют реакцию окисления путем включения одного атома молекулярного кислорода в молекулу субстрата (нуклеофильные или электрофильные соединения) с образованием гидроксильной группы [1]. Окисление этих соединений изменяет их физические и химические свойства, такие как полярность, растворимость, реакционная способность и восприимчивость для дальнейших ферментативных модификаций [2].

Флавинсодержащие монооксигеназы обнаружены у всех царств организмов. В геномах бактерий и одноклеточных эукариот присутствует один ген FMO, млекопитающих и человека – пять генов FMO, тогда как в геномах растений генов FMO значительно больше. Например, у модельного вида *Arabidopsis thaliana* их 29, у ячменя *Hordeum vulgare* – 41 [1, 3].

На основе филогении и наличия специфичных мотивов FMO разделяют на восемь классов (A–H). У растений найдены только FMO класса B, которые встречаются во всех царствах живых организмов и катализируют гидроксилирование соединений, содержащих гетероатомы (азот, сера, фосфор, селен и йод) [1]. FMO класса B строго зависят от наличия никотинамидного кофермента (NADH или NADPH) для восстановления флавина (в частности, флавинадениндинуклеотида, FAD). До связывания с субстратом фермент FMO образует комплекс с NADPH, что приводит к восстановлению связанной с ферментом молекулы FAD. Восстановленный комплекс флавин–фермент связывает молекулярный кислород, в результате чего образуется нестабильный промежуточный продукт C4a-гидропероксифлавин с высокой реакционной способностью. При реакции фермента с субстратом, содержащим гетероатом (например, азот или серу), с которым он может взаимодействовать, один атом молекулярного кислорода переносится на субстрат. В результате

высвобождаются NADP+ и вода, а связывание NADPH запускает новый цикл [1, 4, 5].

Функции флавинсодержащих монооксигеназ наиболее изучены у человека и животных. Ключевой физиологической ролью FMO является детоксикация широкого спектра ксенобиотиков в печени, поскольку опосредованное FMO гидроксилирование делает молекулы более полярными и облегчает их экскрецию, детоксикацию и транспорт [1, 6]. Также показано, что FMO участвуют в старении и гомеостазе холестерина, а нарушение функций/дисбаланс FMO приводит к таким заболеваниям, как триметиламинурия (неспособность метаболизировать триметиламин из пищевых источников) и атеросклероз [7, 8]. Бактериальные и грибные FMO нашли применение в биотехнологии производства красителей и фармацевтических препаратов [1].

Наличие у растений по сравнению с животными большего числа генов FMO предполагает, что растения могут более широко использовать это семейство ферментов, чем это делают остальные организмы [3]. Показано, что у растений FMO участвуют в биосинтезе ауксинов, метаболизме гликозидов и других веществ, участвующих в сигнальных путях развития и ответа на стрессы [1, 3]. Существуют четыре пути биосинтеза ауксина из аминокислоты триптофана. Флавинсодержащие монооксигеназы подсемейства YUCCA катализируют реакцию окислительного декарбоксилирования индол-3-пирувата с образованием индолилуксусной кислоты (ауксин) [9, 10]. Различия в пространственно-временном профиле экспрессии белков YUCCA определяют локальный биосинтез ауксина в растениях, способствуя их развитию и адаптивности [1, 11].

Реакция окисления серы, катализируемая ферментами подсемейства $FMO_{GS\text{-}OX}$, является важным этапом биосинтеза различных сераорганических соединений у растений. Например, в результате S-оксигенирования образуются специфичные для представителей порядка Brassicales глюкозинолаты, которые придают растениям резкий и терпкий вкус и вместе с продуктами распада (репеллентами и токсинами) обеспечивают защиту от фитопатогенов и травоядных животных [12, 13]. У чеснока *Allium sativum* идентифицирован ген *AsFMO1*, продукт которого осуществляет высокостереоселективное S-оксигенирование S-аллил-L-цистеина с образованием аллиина, из которого затем образуется аллицин – сераорганическое соединение, придающее чесноку характерный вкус и аромат [14, 15].

Окисляющие азот флавинсодержащие монооксигеназы играют критическую роль в иммунитете растений [16]. Так, патоген-индуцируемый путь деградации L-лизина осуществляется через стадию образования N-гидроксипипеколиновой кислоты – критического регулятора системной приобретенной устойчивости (SAR) к патогенной инфекции [1, 11].

К настоящему времени гены семейства FMO идентифицированы и охарактеризованы у многих видов растений. У чеснока *A. sativum* известен только один ген семейства FMO – *AsFMO1*, продукт которого, как говорилось выше, участвует в биосинтезе аллиина. Цель настоящей работы – идентификация и характеристика генов флавинсодержащих монооксигеназ в геноме чеснока *A. sativum* и анализе их экспрессии в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов FMOs у A. sativum. Поиск последовательностей генов флавинсодержащих монооксигеназ проводили в геноме и транскриптоме чеснока *A. sativum* cv. Ershuizao, доступных в базе данных NCBI (PRJNA606385, сборка Garlic.V2.fa; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) [17]. В качестве референса использовали последовательности мРНК генов *FMO*s *A. thaliana* [14]. Выравнивание и анализ последовательностей *FMO*s проводили в программе MEGA 7.0 (https://www.megasoftware.net/). Консервативные домены и мотивы белков определяли с помощью программ NCBI-CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), MEME 5.1.1 (http://meme-suite.org/tools/meme) и литературных данных. Для поиска доменов связывания с кофакторами FAD/NADPH использовали программу Cofactory-1.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0) и литературные данные. Молекулярную массу и изоэлектрическую точку (pI) рассчитывали с помощью ExPASy (https://web.expasy.org/protparam/). Локализацию белков предсказывали с помощью программы LocTree3 (https://rostlab.org/services/loctree3/). *Цис*-регуляторные элементы в промоторных областях идентифицировали с помощью PlantCare (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/).

Растительный материал. Для проведения работы использовали растения чеснока сортов Сармат и Стрелец (луковицы предоставлены Федеральным научным центром овощеводства, Московская обл.). Растения выращивали в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/($м^2$/с)). Через 90 дней собирали различные органы растения (корни, донце, луковица, листья, цветонос, цветоложе и воздушные луковицы) и использовали для анализа профиля экспрессии генов *FMO*s.

Для исследования изменения уровней транскриптов генов *FMO*s в ответ на инфицирование грибным патогеном *F. proliferatum* использовали

зубки устойчивого (Сармат) и восприимчивого (Стрелец) к фузариозной гнили сортов чеснока. Заражения проводили по описанной нами ранее методике [18, 19]: зубки каждого сорта стерилизовали в 70%-ном этаноле (3 мин), промывали дистиллированной водой, помещали на чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и инкубировали при 25°C в темноте. Через 72 ч половину зубков каждого сорта заражали грибом *F. proliferatum* изолят Стрелец [20] путем вымачивания в течение 5 мин в суспензии конидий (~10^6 конидий/мл). Затем зубки помещали на чашки Петри и инкубировали при 25°C в темноте. Неинфицированные зубки использовали в качестве контроля. Для анализа экспрессии генов *FMO*s у каждого из сортов чеснока отбирали корни через 24 и 96 ч после заражения (по два биологических повтора для каждого сорта).

Выделение ДНК, РНК, синтез кДНК. Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set; QIAGEN, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Из ткани листьев выделяли геномную ДНК с помощью CTAB-буфера (100 мМ Tris (pH 8.0), 20 мМ ЭДТА (pH 8.0), 2 М NaCl, 2% PVP, 5% меркаптоэтанола (w/v), 2% CTAB (w/v), 10 мМ ацетата аммония). Качество препаратов ДНК и РНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Концентрацию препаратов нуклеиновых кислот измеряли на приборе Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Амплификация и секвенирование последовательности AsFMO35. С помощью праймеров (5'-TCACACTTGTCCCGGTCAT-3' и 5'-CAGTTAATCCACATCACCTCA-3') на препаратах кДНК корней сортов Сармат и Стрелец амплифицировали и секвенировали кодирующие последовательности гена *AsFMO35.* На препаратах геномной ДНК сортов Сармат и Стрелец с помощью праймеров (5'-TAGCCAAACCATAACTTTCTAG-3' и 5'-ACGTTATCGAGAACGTCTTCA-3') амплифицировали и секвенировали промоторную (~1000 пн) область гена *AsFMO35.* Полученные ампликоны секвенировали на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН) и анализировали в программе MEGA7.0.

Определение профиля экспрессии генов FMOs. Профиль экспрессии генов *FMO*s определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов *FMO*s разрабатывали специфичные праймеры (табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *FMO*s оценивали, используя референсные гены *GAPDH* и *UBQ* [19]. Для РВ-ПЦР использовали набор "Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX" (ООО "Синтол", Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для визуализации данных и статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v 8 (https://www.graphpad.com).

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения РВ-ПЦР

Ген	Последовательность праймера (5' → 3')
AsFMO4	CAGTGTTCAGCACGGAGTTGAT
	CATTTGGTGGAAAGCTTGGGATG
AsFMO10	GTGCGATCTTGTACCTTTAGCTG
	TTCTGGTCCTTTGCCCTGAC
AsFMO11	CTGGCGAATGGCATGTGACTA
	GTAGGGATCCTTGGTTTGTTGCT
AsFMO12	CTGGGTACAAGGGGGATGAAAATT
	CTAGTTGTGGGATACGAGGG
AsFMO18	TGCGGAGATTCCTGGAATTGATG
	GGCAAATCTGGCAACATCTCTTG
AsFMO34	ATGAGGTCAGGACGTGGGAT
	CTGAAGCGTCCAATGCACAG
AsFMO35	CCGAGCCTATAGAGACTGATC
	GTAGTAGTAGTTGGAGAAGAAGCA

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и анализ последовательностей FMOs чеснока

В результате проведенного поиска в геноме чеснока *A. sativum* (cv. Ershuizao, PRJNA606385) [17] было идентифицировано 39 последовательностей, кодирующих флавинсодержащие монооксигеназы, что существенно больше, чем у модельного вида *A. thaliana* (29 генов), и почти совпадает с количеством генов данного семейства у ячменя (41) [1] (табл. 2). Это может быть связано с повышенной скоростью дупликации генов *A. sativum* в связи с мужской стерильностью данного вида и адаптацией чеснока к самым разным эколого-географическим нишам [21].

Было определено, что идентифицированные гены *AsFMO*s локализуются на хромосомах 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, при этом на хромосомах 2, 3, 4 и 6 гены располагаются преимущественно кластерами (рис. 1,*а*), что предполагает происхождение последних в результате кластерной дупликации и возмож-

Таблица 2. Характеристика генов *AsFMO*s, найденных в геноме *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385)

Ген	Ген ID [17]	Локализация в геноме	Длина, пн	Число экзонов	CDS, пн	Белок, ао	MW, кДа	pI
AsFMO1	Asa2G00563.1	chr2:178565470..178567394	1925	5	1566	521	60.51	8.68
AsFMO2	Asa2G00564.1	chr2:179085308..179087234	1927	5	1569	522	60.05	8.61
AsFMO3	Asa2G00566.1	chr2:179585518..179587463	1946	5	1497	498	57.29	7.90
AsFMO4	Asa2G01829.1	chr2:509274501..509278822	4322	3	1527	508	57.23	7.13
AsFMO5	Asa2G01873.1	chr2:520505798-520507326	1529	3	1260	419	47.14	7.54
AsFMO6	Asa2G02211.1	chr2:613535251-613536670	1420	3	1257	418	46.8	8.38
AsFMO7	Asa2G05158.1	chr2:1404441386..1404443330	1945	5	1572	523	60.35	8.41
AsFMO8	Asa2G05159.1	chr2:1404695990..1404697879	1890	3	897	298	34.38	9.25
AsFMO9	Asa3G01542.1	chr3:413006960-413008314	1355	4	1101	366	40.71	8.87
AsFMO10	Asa3G01750.1	chr3:469416393..469423516	7124	5	1224	407	46.04	8.95
AsFMO11	Asa3G01757.1	chr3:470140014..470142303	2290	5	1554	517	58.26	7.86
AsFMO12	Asa3G01758.1	chr3:470836804..470839146	2343	5	1557	518	58.58	8.58
AsFMO13	Asa3G01764.1	chr3:471340029..471345878	5850	7	1668	555	62.80	6.13
AsFMO14	Asa3G01829.1	chr3:488097425-488098809	1385	4	1128	375	41.63	8.83
AsFMO15	Asa3G01832.1	chr3:488256596-488257950	1355	4	1101	366	40.43	8.62
AsFMO16	Asa3G04411.	chr3:1214016645..1214019971	3327	8	1035	344	39.36	6.11
AsFMO17	Asa3G04881.1	chr3:1356644444..1356647057	2614	4	966	321	36.33	6.45
AsFMO18	Asa3G05097.1	chr3:1436738168..1436757284	19 117	7	1374	457	50.57	5.99
AsFMO19	Asa4G04959.1	chr4:1349548769..1349551625	2857	7	1371	456	52.39	6.64
AsFMO20	Asa4G04963.1	chr4:1349970865..1349974164	3300	7	1398	465	53.45	6.51
AsFMO21	Asa4G05174.1	chr4:1411323304-1411326160	2857	4	1194	397	43.74	8.85
AsFMO22	Asa5G01162.1	chr5:277255700-277257092	1393	4	1146	381	42.31	7.13
AsFMO23	Asa5G02100.1	chr5:537732944-537735419	2476	4	1203	400	44.38	9.13
AsFMO24	Asa5G03493.1	chr5:916164858-916166644	1878	3	1191	396	44.18	8.28
AsFMO25	Asa5G05156.1	chr5:1391616063-1391618783	2721	4	1203	400	44.95	9.23
AsFMO26	Asa6G01973.1	chr6:516470472-516471830	1359	4	1101	366	40.45	8.65
AsFMO27	Asa6G02575.1	chr6:653898897-653900282	1386	4	1116	371	41.19	8.81
AsFMO28	Asa6G02576.1	chr6:654152583-654153984	1402	4	1146	381	41.99	8.77
AsFMO29	Asa6G02577.1	chr6:654185319-654186677	1359	4	1101	366	40.62	9.03
AsFMO30	Asa6G04803.1	chr6:1294764827-1294769658	4832	4	1320	439	49.66	9.21
AsFMO31	Asa6G05996.1	chr6:1658620606-1658623858	3253	4	1233	410	45.94	9.00
AsFMO32	Asa7G00434.1	chr7.1:159310605-159311930	1326	2	1233	410	45.9	8.89
AsFMO33	Asa7G01650.1	chr7.1:452936301-452937625	1325	2	1233	410	45.9	8.89
AsFMO34	Asa7G07228.1	chr7.2:925441006..925444175	3170	5	1527	508	57.18	8.49
AsFMO35	Asa8G00387.1	chr8:123423317..123428786	5468	5	1536	511	57.66	6.35
AsFMO36	Asa0G00609.1	scaffold13024:6793-8304	1512	4	1230	409	46.23	6.52
AsFMO37	Asa0G01058.1	scaffold15137:38288-40207	1320	5	1128	375	42.27	8.81
AsFMO38	Asa0G01059.1	scaffold15138:21603-23787	2185	5	1065	354	40.04	8.87
AsFMO39	Asa0G03474.1	scaffold2776:21775-23668	1894	4	1197	398	44.72	8.27

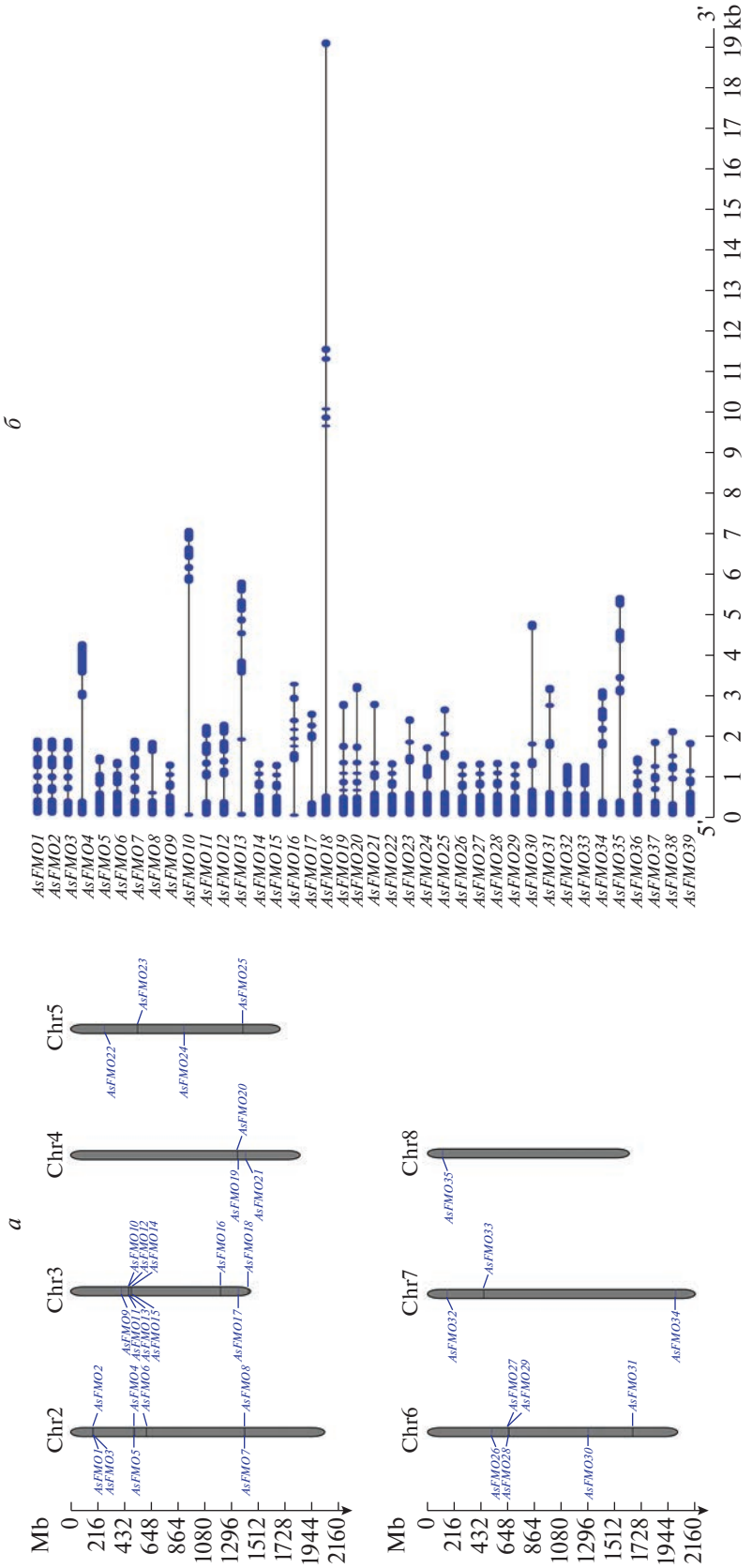

Рис. 1. Локализация генов *AsFMO*s на хромосомах чеснока *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385) (*а*) и их экзон-интронная структура (*б*).

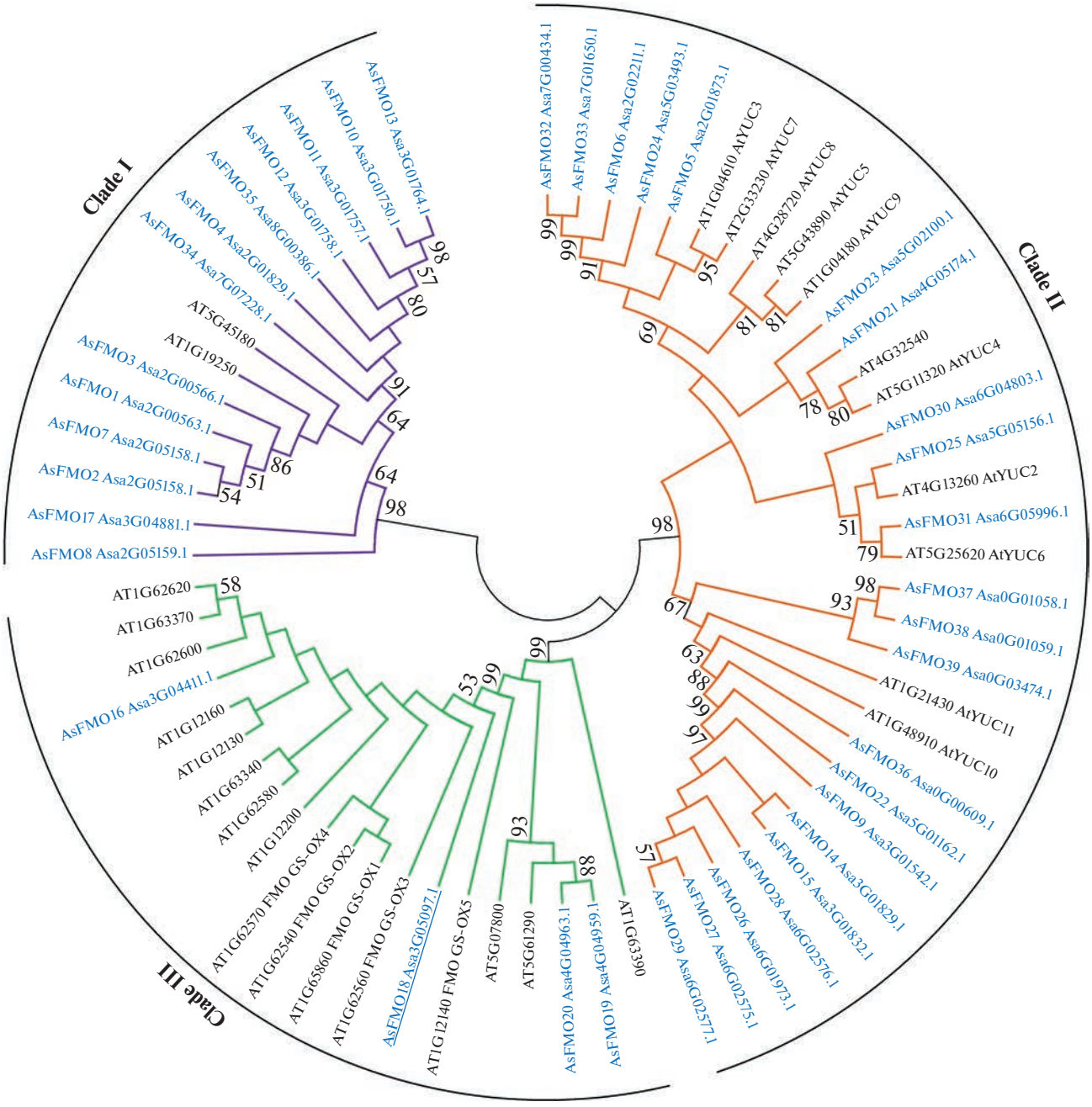

Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей FMO чеснока *A. sativum* (As, синий шрифт) и *A. thaliana* (AT, черный шрифт). Дендрограмма получена с помощью программы MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood, 1000 бутстреп-реплик).

ное сходство их функций. Для генов *AsFMO36–39* хромосомная локализация выявлена не была, поскольку последовательности были обнаружены в некартированных скаффолдах (табл. 2).

Найденные гены *AsFMO*s имели длину от 1320 до 19117 пн и содержали от двух до восьми экзонов (рис. 1,*б*), размер кодирующих последовательностей варьировал от 897 до 1668 пн (табл. 2). Молекулярная масса белков AsFMOs варьировала в пределах 34.38–62.80 кДа, изоэлектрическая точка – от 5.99 до 9.25 (табл. 2). Согласно предсказанию в программе LocTree3 все белки AsFMOs локализованы в цитоплазме.

На дендрограмме, построенной на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей FMO *A. sativum* и *A. thaliana,* было выявлено четкое разделение белков на три клады (рис. 2), что характерно для растительных FMO,

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей AsFMOs клады I (фиолетовый шрифт), клады II (желтый) и клады III (зеленый). Зелеными рамками выделены найденные с помощью программы Cofactory-1.0 мотивы связывания с FAD и NADPH, консенсус GxGxxG подчеркнут. Указаны мотивы FMO (оранжевая рамка) и FATGY (фиолетовая рамка).

согласно [1]. Члены клады I предположительно осуществляют реакцию N-оксигенации и вовлечены в ответ на заражение патогенами [11]. В кладу I вошли только два белка *A. thaliana* и 13 белков *A. sativum*, что может свидетельствовать о повышенной адаптивности чеснока к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также о возможной избыточной, дополняющей и/или взаимозаменяющей роли генов *AsFMO* по отношению к друг другу. В кладу II, объединяющую FMO, вовлеченные в биосинтез ауксина [1], вошли 22 белка *A. sativum* и 11 *A. thaliana*. К кладе III, предположительно имеющей отношение к реакции S-оксигенации [1], относятся 16 белков *A. thaliana* и 4 – чеснока, включая AsFMO18, участвующий в биосинтезе аллиина, согласно [14].

Интересно, что гены *AsFMO10–13* и *AsFMO14,15*, которые локализованы в одном кластере на хромосоме 3 (рис. 1,*а*), относятся при этом к разным кладам – I и III соответственно (рис. 2). Это может указывать на явление неофункционализации дуплицированных генов, либо о совмещении ими функций, свойственных для обеих клад.

С помощью программы Cofactory-1.0 и литературных данных [3, 22] в белках AsFMOs был проведен поиск мотивов связывания с FAD и NADPH, FMO-последовательности и других консервативных мотивов (рис. 3, табл. 3). В результате было

Таблица 3. Последовательности консервативных мотивов в белках AsFMOs. Выделенные зеленым аминокислотные остатки идентичны консенсусу

Белок	FAD-мотив GxGxxG	NADPH-мотив GxGxxG	FATGY-мотив F/LATGY	FMO-мотив FxGxxxHxxxY/F
Клада I				
AsFMO1	GGGISG	GYKKSA	LATGF	FHGQVMHSLDY
AsFMO2	GGGISG	GYKKSA	LATGF	FQGKVMHSLDY
AsFMO3	GGGISG	GYKKSA	LATGF	FQGKVMHSLDY
AsFMO4	GAGLSG	GCMKSG	FATGF	FSGKVIHSMDY
AsFMO7	GGGISG	GYKKSA	LATGF	FQGKVMHSLDY
AsFMO8	GGGISG	н/о	н/о	н/о
AsFMO10	н/о	GCLKSA	FATGY	LQGQVLHSKDC
AsFMO11	GAGISG	GCLKSA	FATGY	FQGQVLHSKDC
AsFMO12	GAGISG	GCSKSA	FATGY	FQGQVLHSKDC
AsFMO13	GAGISG	н/о	FATGY	FQGQVLHSRDC
AsFMO17	GAGISG	GFLKSA	н/о	FQGQVLHSKDC
AsFMO34	GAGLSG	GCMKSG	LATGY	FKGKMVHSVEY
AsFMO35	GAGLSG	GCKKSG	YATGY	FKGQVIHSLDY
Клада II				
AsFMO5	GAGPSG	GCGNSG	YATGY	FSGEVLHASDY
AsFMO6	GAGPSG	GCGNSG	MATGY	FGNPITHVCNY
AsFMO9	н/о	GCGNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO14	RAGPGG	GCGNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO15	н/о	GCGNSG	FATGY	FGGKVLHSSEF
AsFMO21	GAGPSG	GCGNSG	FATGY	FCKRAVHTCGY
AsFMO22	GAGPGG	GCGNSG	LATGY	FSGEVLHSSQY
AsFMO23	GAGPSG	GSGNSG	LATGY	FKGGLMHSSEY
AsFMO24	GAGPSG	GCGNSG	LATGY	CCTNVLHVSDY
AsFMO25	GAGPSG	GCGNSG	FATGY	FEGRKIHVSAY
AsFMO26	н/о	GCGNSG	FATGY	FSGKVIHSSEF
AsFMO27	GAGPGC	GCGNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO28	GAGPGG	GCGNSG	FATGY	FSGKVIHSSEF
AsFMO29	н/о	GCGNSG	FATGY	FSGKVMHSSEF
AsFMO30	GAGPSG	GCGNSG	LATGY	FKGQIIHTSCY
AsFMO31	GAGPSG	GCGNSG	LATGY	YKGIVMHTSSY
AsFMO32	GAGPSG	GCGNSG	MATGY	FGSQITHVSDY
AsFMO33	GAGPSG	GCGNSG	MATGY	FGSQITHVSDY
AsFMO36	GAGPAG	GSGNSG	FATGY	FKGDMMHSCQY
AsFMO37	GAGPAG	GSGNSG	LATGY	FIGKVMHSSEY
AsFMO38	н/о	GSGNSG	LATGY	FIGKVMHSSEY
AsFMO39	GAGPAG	GSGNSG	LATGY	FIGTDIAYIIASKYAFSELIQSLITGKVLHSSEY
Клада III				
AsFMO16	н/о	GCGPSA	HCTGY	FVGLCNKVIIF
AsFMO18	GAGAAG	GSSASA	HCTGY	FVGIPWKIVPF
AsFMO19	GAGPSG	GNSMSG	YCTGY	FVGIPRKLIGF
AsFMO20	GAGPSG	GNSMSG	YCTGY	FVGIPRKLIGF

Примечание. н/о – мотив не обнаружен.

показано, что AsFMO9, 10, 15, 16, 26, 29 и 38 не содержат FAD-связывающего мотива, а AsFMO8 и 13 – NADPH-связывающего мотива. В FAD-связывающем мотиве остальных белков AsFMOs (кроме AsFMO14 и 27) был идентифицирован консенсус складки Россмана "GxGxxG" (табл. 3). В NADPH-связывающем мотиве консенсус "GxGxxG" был выявлен только у AsFMOs клады II, тогда как в белках AsFMOs клад I и III последовательность консенсуса оказалась вариабельной (Gxxxxx, GxxxxG, GxGxxx) (табл. 3). Это находится в согласии с ранее опубликованными данными о том, что у растительных FMOs последовательность NADPH-связывающего мотива менее консервативна по сравнению с FAD-связывающим мотивом [3]. В подтверждение полученным нами данным все белки FMOs *A. thaliana* содержат в FAD-связывающем мотиве консенсус "GxGxxG", в то время как консенсус "GxGxxG" в NADPH-связывающем мотиве выявлен только у белков подсемейства YUCCA (клада II), а у белков клад I и III – только в виде "Gxxxxx" или "GxxxxG" [23]. Возможно, это является характеристикой именно растительных белков FMO, относящихся к кладам I и III, что может быть связано с особенностями белковых взаимодействий в процессе выполнения функций в биосинтезе ауксинов или S-оксигенации субстратов.

FMO-идентифицирующий мотив был обнаружен во всех белках AsFMOs, кроме AsFMO8 (рис. 3). При этом у белков клад I и II он располагался между FAD- и NADPH-связывающими мотивами, а у белков клады III – на C-конце, что согласуется со структурной спецификой растительных белков FMO, касающейся локализации FMO-мотива, показанной ранее [24]. Так, расположение FMO-мотива на C-конце белков характерно для S-окисляющих FMO (клада III); у N-окисляющих FMO (клада I) и белков подсемейства YUCCA (клада II) FMO-мотив располагается между FAD- и NADPH-связывающими мотивами [1, 3]. В белке AsFMO39 FMO-мотив был более протяженным, чем в остальных белках AsFMOs (табл. 3). Подобное явление, а также отсутствие FMO-мотива (как у AsFMO8) ранее были выявлены у белков *A. thaliana* AT1G63390 (отсутствие мотива) и AT1G62580 (более протяженный мотив) [3]. Специфичный для FMO-мотива консенсус "FxGxxxHxxxY/F" был найден в последовательности 26 белков AsFMOs и его менее консервативный вариант – у остальных белков (табл. 3). У *A. thaliana* консенсус "FxGxxxHxxxY/F" содержался в FMO-мотивах белков клад I и II, а в белках клады III данный консенсус был менее консервативен [3].

Консервативный FATGY-мотив, обычно характерный для всех FMO [1], был идентифицирован на C-конце белков AsFMOs, кроме AsFMO8 и 17 (рис. 3, табл. 3). В белках клад I и II данный мотив более соответствовал консенсусу "F/LATGY", а в белках клады III данный мотив был представлен только аминокислотами TGY. В целом наличие только аминокислот TGY в FATGY-мотиве характерно для растительных FMO клады III [3]. Это может свидетельствовать о значимости именно данных трех аминокислот для осуществления активности ферментами FMO растений. Отсутствие мотива может предполагать изменения в функции соответствующих белков.

В последовательностях белков AsFMOs была проведена сравнительная характеристика консервативных мотивов (MEME 5.1.1) (рис. 4). Было идентифицировано 15 мотивов и показано четкое соответствие полученных консенсусных профилей разделению белков на клады. Мотивы 12 и 13 были специфичны для белков клады I, тогда как мотивы 3, 5, 6 и 10 – для белков клады II, что предполагает связь данных мотивов с функциональной специфичностью AsFMOs. Для белков клады III специфичных мотивов обнаружено не было, что может указывать на более раннее происхождение данных AsFMOs и свойственную им первоначальную роль в реакции S-оксигенации.

Профиль экспрессии генов AsFMOs в различных органах растения чеснока

Транскриптомные данные *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA607255, GSE145455) [17] были использованы для *in silico* оценки уровней транскриптов генов *AsFMO*s в различных тканях растения чеснока (рис. 5). Было обнаружено, что экспрессия генов *AsFMO*s в анализируемых тканях низкая (FPKM < 10) либо отсутствует, за исключением генов *AsFMO4*, *AsFMO10*, *AsFMO11*, *AsFMO18*, *AsFMO34* и *AsFMO35*, для которых во всех или в отдельных органах были выявлены значения FPKM > 10 (рис. 5). Транскрипты генов *AsFMO4*, *AsFMO10*, *AsFMO11*, *AsFMO18* и *AsFMO35* присутствовали во всех анализируемых органах чеснока, при этом максимальные значения экспрессии детектированы в корнях, листьях, ложном стебле, цветках и проростках. Ген *AsFMO34* экспрессировался преимущественно в листьях и проростках (рис. 5).

Методом РВ-ПЦР нами был определен профиль экспрессии генов *AsFMO4*, *AsFMO10*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, *AsFMO18*, *AsFMO34* и *AsFMO35* в корне, луковице, донце, ложном стебле, листе, цветоносе, цветоложе и воздушной луковице чеснока сорта Сармат (рис. 6). Было обнаружено, что транскрипты *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, *AsFMO18* и *AsFMO35* присутствуют во всех анализируемых органах. Максимальные уровни экспрессии гена *AsFMO4* наблюдались в корнях и листьях, гена *AsFMO11* – в цветоносе и цветоложе, *AsFMO12* –

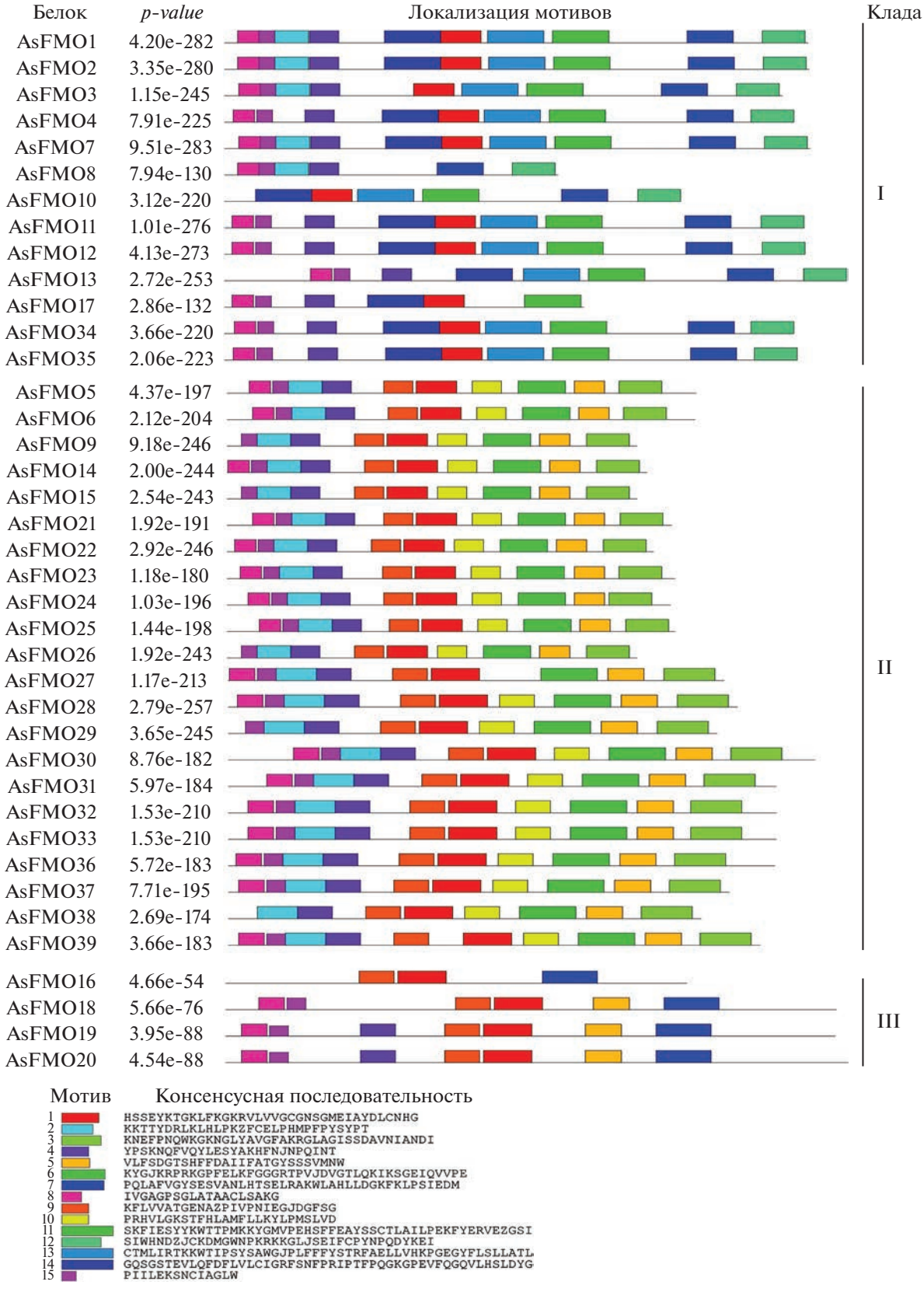

Рис. 4. Идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках AsFMOs.

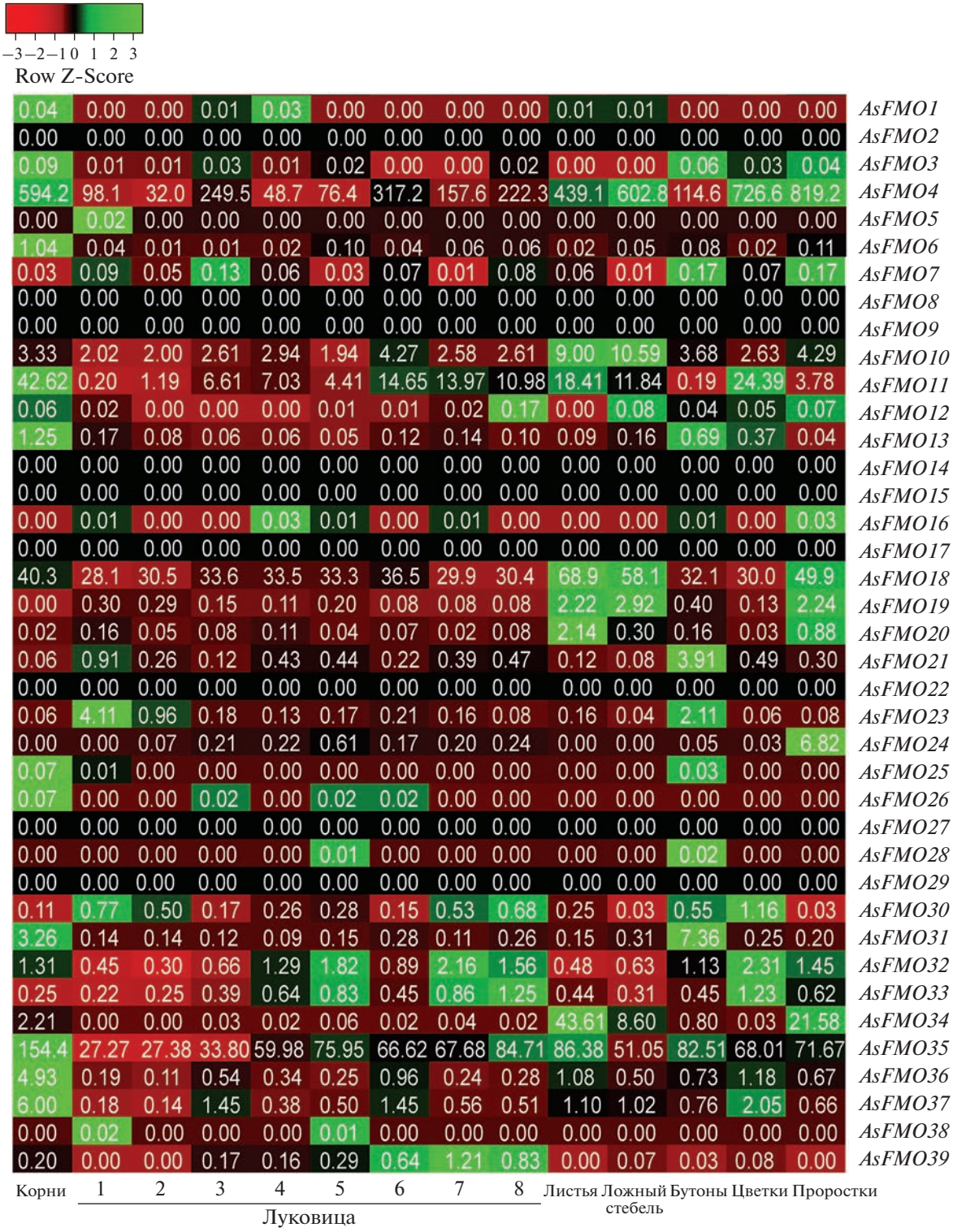

Рис. 5. Тепловая карта экспрессии генов *AsFMO*s у *A. sativum* cv. Ershuizao в корнях, луковицах (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответствуют 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дням развития луковицы), листьях, ложном стебле, бутонах, цветках и проростках. Цвета от красного к зеленому показывают градиент экспрессии гена от низкого к высокому. Цифрами указаны значения FPKM согласно транскриптомным данным [17].

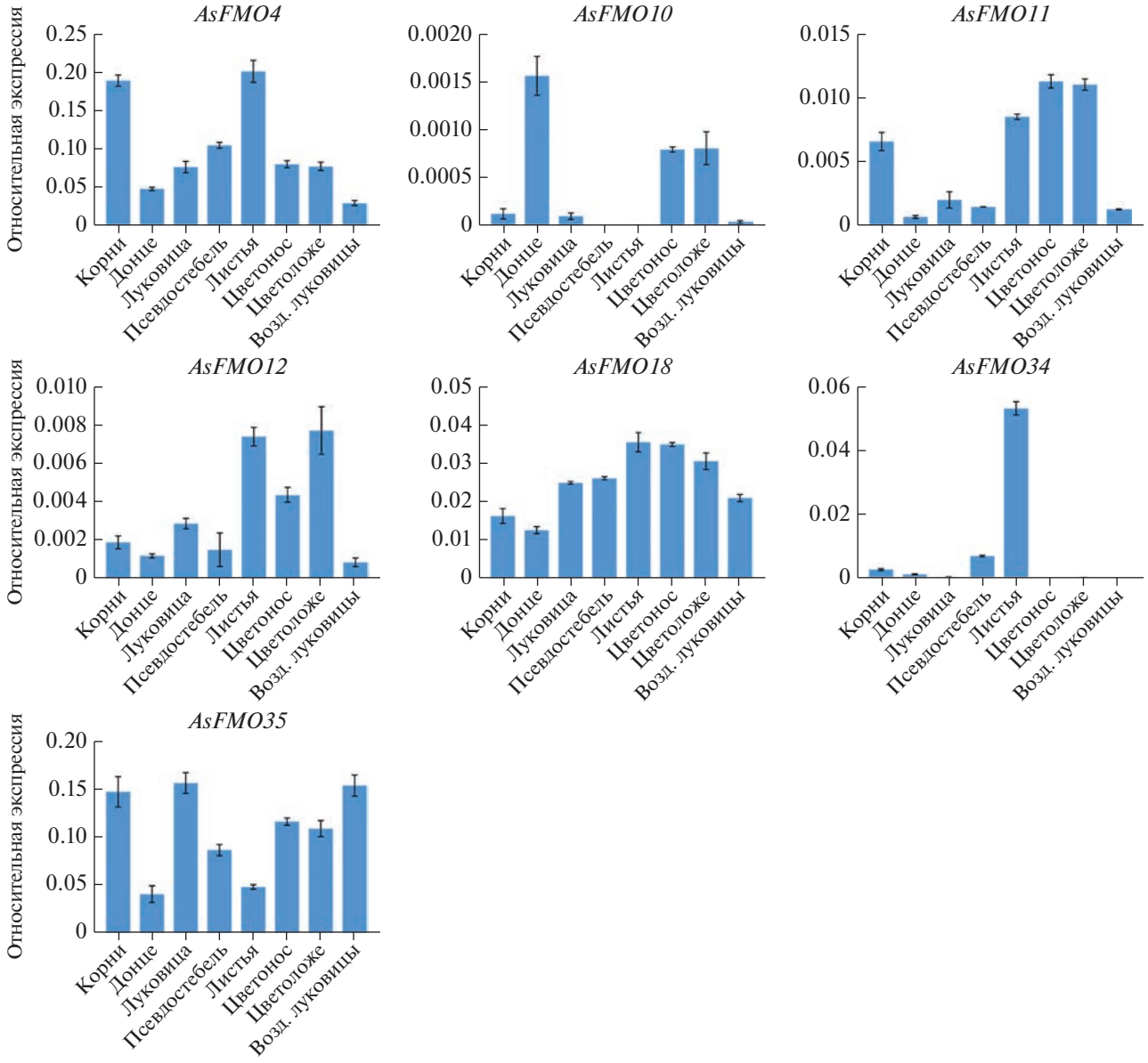

Рис. 6. Профиль экспрессии генов *AsFMO*s в различных органах чеснока сорта Сармат. Данные нормализовали по уровням транскрипции генов *GAPDH* и *UBQ*.

в листьях и цветоложе, *AsFMO35* – в корнях, луковице и воздушных луковицах (рис. 6). Ген *AsFMO18*, продукт которого участвует в биосинтезе аллиина [14], экспрессировался во всех анализируемых органах чеснока с максимумом в листьях, цветоносе и цветоложе. Максимальный уровень транскриптов гена *AsFMO10* был выявлен в донце, при этом в ложном стебле и листьях транскрипты *AsFMO10* отсутствовали. Максимальный уровень экспрессии *AsFMO34* был детектирован в листьях, а в цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах транскрипты данного гена зафиксированы не были (рис. 6).

Полученные результаты в целом согласуются с данными экспрессионного *in silico* анализа *A. sativum* cv. Ershuizao – максимальные уровни транскриптов генов *AsFMO*s характерны для корней и листьев (рис. 5). Исключение составили данные по экспрессии *AsFMO12* – по данным транскриптомного анализа слабая экспрессия данного гена наблюдается в корнях, ложном стебле, цветках и проростках, тогда как по данным РВ-ПЦР – ген экспрессируется во всех органах с максимумом в листьях и цветоложе (рис. 6). Это может быть связано с различиями в генотипе анализируемых сортов cv. Ershuizao (*in silico*) и Сармат (РВ-ПЦР).

Профиль экспрессии генов AsFMOs в ответ на заражение Fusarium proliferatum

С целью определить, участвуют ли гены *AsFMO*s в ответе на биотические стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскриптов генов *AsFMO4*, *AsFMO10*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, *AsFMO18*, *AsFMO34* и *AsFMO35* в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum*. Анализ проводили методом РВ-ПЦР в корнях чеснока сортов Сармат (устойчив к фузариозной гнили) и Стрелец (восприимчив к фузариозной гнили) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum* (рис. 7).

В корнях контрольных растений (без заражения) сортов Сармат и Стрелец уровень транскриптов генов *AsFMO*s не менялся или менялся незначительно в период 24–96 ч, за исключением генов *AsFMO11* и *AsFMO12* у сорта Сармат и гена *AsFMO35* у сорта Стрелец (резкое падение экспрессии в период 24–96 ч); также для гена *AsFMO4* у сорта Стрелец и *AsFMO18* у сорта Сармат наблюдался легкий подъем уровня транскриптов от 24 к 96 ч (рис. 7).

Через 24 ч после заражения *F. proliferatum* в корнях обоих сортов была выявлена активация транскрипции анализируемых генов *AsFMO*s, за исключением *AsFMO11* у сорта Сармат, уровень транскриптов которого рос, но незначительно (рис. 7).

Через 96 ч после заражения у устойчивого к фузариозной гнили сорта Сармат активировалась транскрипция генов *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35*, а уровни экспрессии *AsFMO10* и *AsFMO18* остались на одном уровне с контролем. В то же время у восприимчивого сорта Стрелец экспрессия большинства генов осталась на уровне контроля, и только у двух генов, *AsFMO12* и *AsFMO35*, оказалась повышенной.

В целом экспрессионный ответ генов *AsFMO*s на заражение *F. proliferatum* в корнях чеснока сортов Сармат и Стрелец был сходен, за исключением реакции гена *AsFMO35*. По отношению к контролю у устойчивого к фузариозной гнили сорта Сармат в точке 96 ч уровень транскриптов гена *AsFMO35* возрос в 7 раз, а у восприимчивого сорта Стрелец – только в 2 раза (рис. 7).

Полученные данные позволяют предположить, что дифференциальная экспрессия генов *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35* может быть связана со степенью устойчивости генотипов чеснока к фузариозной гнили. Все четыре гена входят в кладу I (рис. 2), т.е. предположительно участвуют в реакции N-оксигенирования субстратов, что указывает на связь данного процесса с устойчивостью растения к патогенам наряду с S-оксигенированием у видов Brassicaceae [12, 13]. Только один ген клады III (ассоциированной с S-оксигенированием; [1]) – *AsFMO18* – был использован нами для сравнительного экспрессионного анализа. Однако для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу, экспрессионный ответ гена *AsFMO18* на заражение был практически идентичен. Это может свидетельствовать о том, что для действенной стимуляции устойчивости к патогенам кроме генов *AsFMO* клады I (и N-оксигенирования) необходимо участие также генов *AsFMO* клады III (и S-оксигенирования).

Анализ последовательностей гена AsFMO35 у сортов чеснока Сармат и Стрелец

Поскольку в корнях сортов чеснока Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, была обнаружена дифференциальная экспрессия гена *AsFMO35* в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum*, нами были проанализированы кодирующие последовательности данного гена и его промоторной области (~1000 пн до старт-кодона). Кодирующие последовательности гена *AsFMO35* были одинаковыми у сортов Сармат и Стрелец и отличались от референса (сорт Ershuizao) четырьмя нуклеотидными заменами (C23G, C120A, A271G и G918A), две из которых приводили к замещениям аминокислотных остатков (S8C и N91D). В промоторной области гена *AsFMO35* у сортов Сармат и Стрелец, в сравнении с референсом, было выявлено пять нуклеотидных замен и однонуклеотидная вставка (–881(A→T), –662(G→A), –628(G→A), –582(T→C), –469(A→C) и –448 insT). При этом замены в положениях –881 и –628 были специфичны для сорта Сармат, замена в положении –582 – специфична для сорта Стрелец.

С помощью программы PlantCare в промоторных областях гена *AsFMO35* сортов Сармат, Стрелец и Ershuizao был проведен поиск *цис*-регуляторных элементов. Всего было найдено 13 типов *цис*-регуляторных элементов, связанных с ответом на гормоны (ABRE, AuxRR-core, TGA-element и ERE), стрессы (MYB, MYC и STRE), свет (Box 4, 3-AF1 binding site и TCT-motif) и с неизвестной функцией (CCGTCC-motif, A-box и AAGAA-motif) (табл. 4). У восприимчивого к фузариозной гнили сорта Стрелец специфичная замена в положении –582(T→C) привела к возникновению элемента ABRE, который отсутствует в промоторах *AsFMO35* у сортов Сармат и Ershuizao (табл. 4). Нуклеотидная замена в положении 662(G→A) у сортов Сармат и Стрелец привела к появлению *цис*-элемента 3-AF1 binding site, который отсутствовал в промоторе у cv. Ershuizao. Как было показано ранее, элемент 3-AF1 binding site встречается в промоторах генов, вовлеченных в ответы на различные стрессы. Например, у винограда (*Vitis quinquangularis*) элемент 3-AF1 binding site является одним из ключевых *цис*-регулятор-

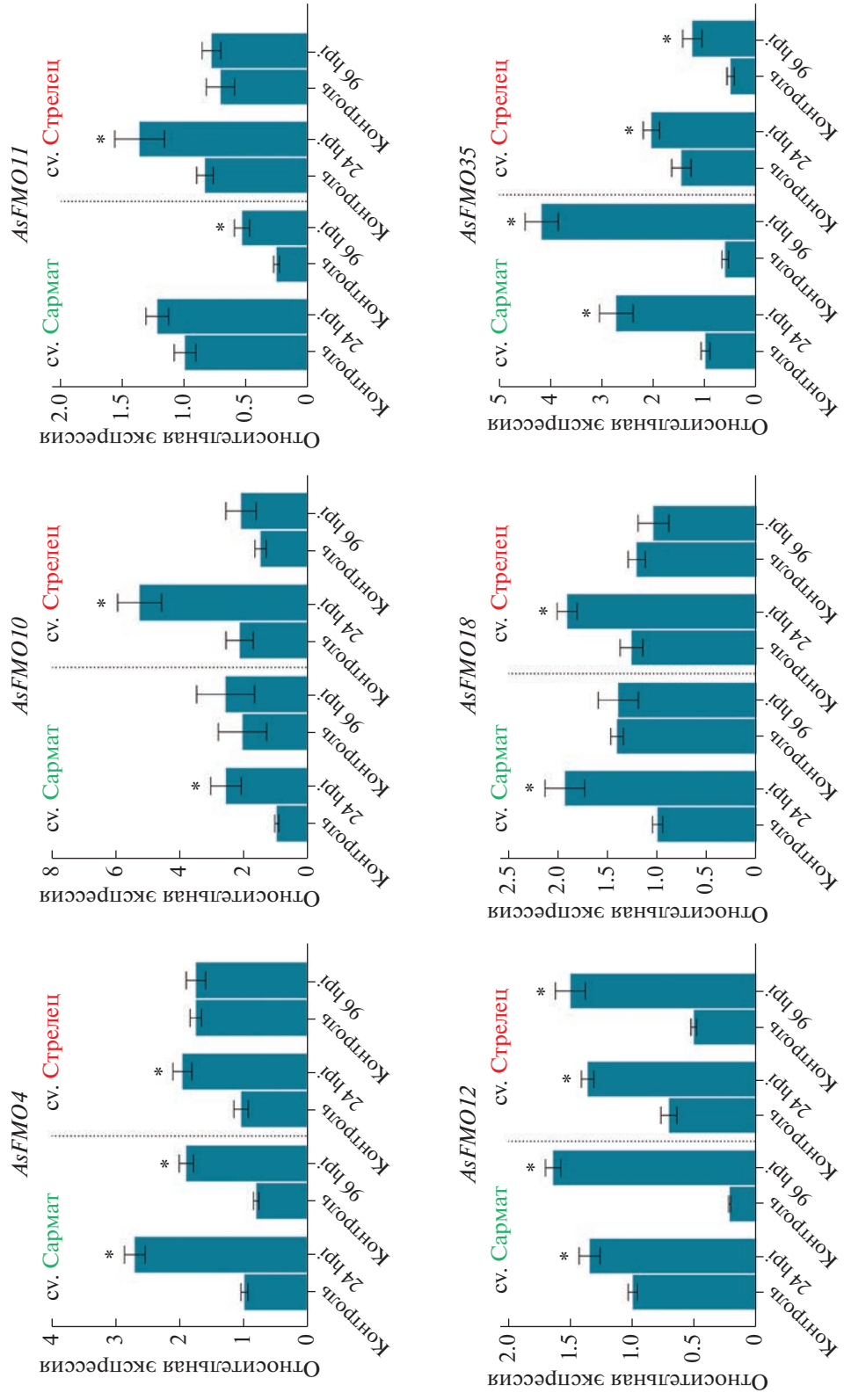

Рис. 7. Изменение уровней транскриптов генов *AsFMO*s в корнях чеснока сортов Сармат (устойчивый) и Стрелец (восприимчивый) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum*. Данные нормализовали по уровням транскриптов генов *GAPDH* и *UBQ* и представляли как кратное изменение (среднее ± стандартная ошибка) от контроля (24 ч) сорта Сармат, принятого за 1; * *p*-value <0.01 в сравнении с неинфицированным контролем. hpi – часов после заражения.

Таблица 4. *Цис*-регуляторные элементы в промоторной области (~1000 пн) гена *AsFMO35* у сортов Ershuizao, Сармат и Стрелец

Сорт	ABRE	AuxRR-core	TGA-element	ERE	Box 4	3-AF1 binding site	TCT-motif	CCGTCC-motif	MYB	MYC	A-box	AAGAA-motif	STRE
Ershuizao		2	1	2	1		2	1	3	2	1	1	2
Сармат		2	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1
Стрелец	1	2	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1

ных элементов в промоторе гена *MYB15*, который играет важную роль в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [25].

В целом, если говорить о различиях в регуляции гена *AsFMO35* у сортов Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, то единственное расхождение связано с появлением элемента ABRE (сцеплен с ответом на АБК) в случае сорта Стрелец (восприимчив к фузариозу) (табл. 4). Поскольку АБК играет одну из ключевых ролей в обеспечении устойчивости растения к стрессам [26], можно предположить, что появление данного элемента в промоторе *AsFMO35* могло повысить степень участия гена в ответе растения чеснока на инфекцию.

Таким образом, в геноме чеснока было идентифицировано 39 генов флавин-содержащих моноокисгеназ. Филогенетический анализ разделил *AsFMO*s на три клады, ассоциированные с N-оксигенированием (I; 22 гена), биосинтезом ауксинов (II; 13 генов) и S-оксигенированием (III; 4 гена). Диспропорция в количестве членов каждой из трех клад (увеличение в кладах I и II, сокращение в кладе III) у чеснока в сравнении с *A. thaliana* может свидетельствовать о повышенной адаптивности чеснока к стрессовым факторам (гены клады I) и значении триптофан-зависимого пути биосинтеза ауксинов (гены клады II).

В аминокислотных последовательностях AsFMOs были найдены характерные мотивы связывания с FAD и NADPH, FMO-идентифицирующий мотив и FATGY-мотив, присутствие и вариабельность которых подтверждали принадлежность к кладам. Отсутствие одного или нескольких мотивов в некоторых AsFMOs может быть связано с изменением или потерей функции у данных белков.

Анализ профиля экспрессии генов *AsFMO*s показал, что транскрипты *AsFMO*s (за исключением *AsFMO34*) присутствуют во всех органах чеснока с максимумом в корнях, листьях, цветоносе и воздушных луковицах.

Анализ экспрессионного ответа выборки генов *AsFMO* на заражение патогенным грибом *F. proliferatum* в корнях чеснока выявил дифференциальную экспрессию генов клады I *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35* между сортами Сармат и Стрелец, контрастными по устойчивости к фузариозной гнили. Такой ответ указывает на связь реакции N-оксигенирования с устойчивостью растения к патогенам наряду с S-оксигенированием. Экспрессионный ответ гена клады III (ассоциированной с S-оксигенированием) – *AsFMO18* – был идентичен для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу, что предполагает обязательное совместное участие генов клад I и III (N- и S-оксигенирования) в стимуляции устойчивости растения к патогенам.

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

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thodberg S., Jakobsen Neilson E.H.* The “Green” FMOs: diversity, functionality and application of plant flavoproteins // Catalysts. 2020. V. 10. Article 329. https://doi.org/10.3390/catal10030329
2. *Van Berkel W.J.H., Kamerbeek N.M., Fraaije M.W.* Flavoprotein monooxygenases, A diverse class of oxidative biocatalysts // J. Biotechnol. 2006. V. 124. P. 670–689. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044
3. *Schlaich N.L.* Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 412–418. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.009

4. *Ziegler D.M.* Flavin-containing monooxygenases: Catalytic mechanism and substrate specificities // Drug Metab. Rev. 1988. V. 19. P. 1–32.

5. *Ziegler D.M.* An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs // Drug Metab. Rev. 2002. V. 34. P. 503–511. https://doi.org/10.1081/dmr-120005650

6. *Yanni S.B., Annaert P.P., Augustijns P. et al.* Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes // Drug Metab. Dispos. 2008. V. 36. P. 1119–1125. https://doi.org/10.1124/dmd.107.019646

7. *Rossner R., Kaeberlein M., Leiser S.F.* Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 11138–11146. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.779678

8. *Krueger S.K., Williams D.E.* Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism // Pharmacol. Ther. 2005. V. 106. P. 357–387. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.001

9. *Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C. et al.* A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis // Science. 2001. V. 291. P. 306–309. https://doi.org/10.1126/science.291.5502.306

10. *Won C., Shen X., Mashiguchi K. et al.* Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108(45). P. 18518–18523. https://doi.org/10.1073/pnas.1108436108

11. *Hartmann M., Zeier T., Bernsdorff F. et al.* Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipecolic acid is a critical element of plant systemic immunity // Cell. 2018. V. 173(2). P. 456–469. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.049

12. *Halkier B.A., Gershenzon J.* Biology and biochemistry of glucosinolates // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 303–333. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228

13. *Kong W., Li J., Yu Q. et al.* Two novel flavin-containing monooxygenases involved in biosynthesis of aliphatic glucosinolates // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Article 1292. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01292

14. *Yoshimoto N., Onuma M., Mizuno S. et al.* Identification of a flavin-containing S-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic // Plant J. 2015. V. 83. P. 941–951. https://doi.org/10.1111/tpj.12954

15. *Yoshimoto N., Saito K.* S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: Proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 4123–4137. https://doi.org/10.1093/jxb/erz243

16. *Mishina T.E., Zeier J.* The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase fmo1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 1666–1675. https://doi.org/10.1104/pp.106.081257

17. *Sun X., Zhu S., Li N. et al.* A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis // Mol. Plant. 2020. V. 13. P. 1328–1339. https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.019

18. *Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Fusarium proliferatum* // Plants. 2021. V. 10. Article 720. https://doi.org/10.3390/plants10040720

19. *Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А.* Идентификация генов монодегидроаскорбатредуктаз (*MDHAR*) чеснока (*Allium sativum* L.) и их участие в ответе на заражение *Fusarium proliferatum* // Генетика. 2022. Т. 58. № 7. С. 754–764. https://doi.org/10.31857/S0016675822070037

20. *Anisimova O.K., Seredin T.M., Danilova O.A., Filyushin M.A.* First report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in Russian federation // Plant Dis. 2021. V. 105. P. 3308. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2743-PDN

21. *Tchórzewska D., Deryło K., Błaszczyk L., Winiarczyk K.* Tubulin cytoskeleton during microsporogenesis in the male-sterile genotype of *Allium sativum* and fertile *Allium ampeloprasum* L. // Plant Reprod. 2015. V. 28. P. 171–182. https://doi.org/10.1007/s00497-015-0268-0

22. *Qin M., Wang J., Zhang T. et al.* Genome-wide identification and analysis on YUCCA gene family in *Isatis indigotica* Fort. and IiYUCCA6-1 functional exploration // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. Article 2188. https://doi.org/10.3390/ijms21062188

23. *Hansen B.G., Kliebenstein D.J., Halkier B.A.* Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* // Plant J. 2007. V. 50. P. 902–910. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03101.x

24. *Eswaramoorthy S., Bonanno J.B., Burley S.K., Swaminathan S.* Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 9832–9837. https://doi.org/10.1073/pnas.0602398103

25. *Li R., Zhu F., Duan D.* Function analysis and stress-mediated cis-element identification in the promoter region of *VqMYB15* // Plant Signal Behav. 2020. V. 15. Article 1773664. https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1773664

26. *Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K.* ABA signaling in stress-response and seed development // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. P. 959–970. https://doi.org/10.1007/s00299-013-1418-1

Flavin-Containing Monooxygenases (*FMO*) Genes in Garlic *Allium sativum* L.: Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis in Response to *Fusarium proliferatum*

O. K. Anisimova[a], A. V. Shchennikova[a], E. Z. Kochieva[a], and M. A. Filyushin[a, *]

[a] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: michel7753@mail.ru*

In this study, 39 flavin-containing monooxygenase genes were identified in the garlic (*Allium sativum* L.) genome. The distribution of AsFMOs into three phylogenetic clades associated with N-oxygenation (22 proteins), auxin biosynthesis (13 proteins), and S-oxygenation (4 proteins) has been shown. FAD and NADPH binding, FMO-identifying, and FATGY motifs were found in the AsFMO sequences. *AsFMO*s transcripts were present in all garlic organs with a maximum in roots, leaves, peduncle, and aerial bulbs. In response to infection with the pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*, differential expression of clade I genes (*AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, and *AsFMO35*) was detected in the roots of cv. Sarmat and Strelets, contrasting in *Fusarium* rot resistance. At the same time, the expression response of the clade III *AsFMO18* gene involved in the alliin biosynthesis was similar for both cultivars, regardless of their resistance/susceptibility to *Fusarium*. This suggests the clades I and III genes redundancy in plant responses to infection. The *AsFMO35* coding and regulatory sequences were analyzed in the Sarmat and Strelets cultivars. It was shown that the *AsFMO35* promoter differs in the presence of the ABA-associated *cis*-regulatory element ABRE in cv. Strelets susceptible to *Fusarium* rot.

Keywords: garlic, *Allium sativum* L., flavin-containing monooxygenase, *Fusarium* rot, expression analysis.