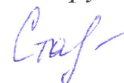


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Ставицкая Злата Олеговна

**ПУТИ НАКОПЛЕНИЯ И РЕЦИРКУЛЯЦИИ АСКОРБИНОВОЙ
КИСЛОТЫ В ПЛОДАХ *MALUS BACCATA* (L.) BORKH. И ЕЕ
 ГИБРИДОВ F1**

1.5.21 – Физиология и биохимия растений

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Рудиковская Елена Георгиевна

Иркутск – 2026

Содержание	2
Список сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1. Аскорбиновая кислота.....	14
1.1. История исследования путей биосинтеза аскорбиновой кислоты.....	15
1.2. Биосинтез аскорбиновой кислоты	16
1.3. Рециркуляция аскорбиновой кислоты	20
1.4. Содержание аскорбиновой кислоты и её локализация в клетках и тканях растений.....	23
1.5. Дальний транспорт аскорбиновой кислоты	25
2. Предшественники синтеза АК.....	26
2.1. Растворимые сахара.....	26
2.2. Пектины	31
3. Род <i>Malus</i> : введение в культуру, селекционный потенциал	36
3.1. История возникновения и современная классификация рода <i>Malus</i> Mill.....	36
3.2. Введение представителей рода <i>Malus</i> в культуру в Сибири	39
3.3. Перспективы развития пребридинговых исследований	40
Глава 2. Материалы и методы.....	45
2.1. Объекты исследования	45
2.2. Методы исследования	54
2.2.1. Выделение аскорбиновой кислоты	54
2.2.2. Анализ содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ	55
2.2.3. Выделение растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) для анализа методом ВЭЖХ	55
2.2.4. Анализ растворимых сахаров методом ВЭЖХ	56
2.2.5. Выделение растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) для анализа методом ГХ-МС	56
2.2.6. Анализ растворимых сахаров методом ГХ-МС	57

2.2.7. Выделение пектиновых фракций.....	57
2.2.8. Количественное определение пектиновых веществ	58
2.2.9. Определение степени этерификация пектиновых цепей.....	59
2.2.10. Выделение ферментов ДГАР, МДГАР, АПО	59
2.2.11. Определение активности ферментов ДГАР, МДГАР, АПО	59
2.2.12. Анализ относительной экспрессии генов <i>GGP1</i> , <i>GGP3</i> , <i>DHAR3</i> , <i>MDHAR1</i>	60
2.2.13. Модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами- предшественниками разных путей синтеза АК («фидинг»)	62
2.2.14. Статистическая обработка результатов	63
Глава 3. Результаты и обсуждение	64
3.1. Содержание АК в тканях на разных стадиях развития плодов.....	64
3.2. Относительная экспрессия генов <i>GGP1</i> , <i>GGP3</i> , <i>DHAR3</i> , <i>MDHAR1</i> в тканях на разных стадиях развития плодов	72
3.3. Анализ удельной активности ферментов рециркуляции АК в тканях на разных стадиях развития плодов.....	76
3.4.Содержание растворимых сахаров и пектинов на разных стадиях развития плодов	82
3.5. Модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами- предшественниками разных путей синтеза АК (фидинг).....	91
Заключение	105
Выводы	113
Список литературы	115

Список сокращений

АГН — апиогалактуронан
АДФ-Г — АДФ-глюкоза
АК — аскорбиновая кислота
АПО — аскорбатпероксидаза
Г — глюкоза
Г-1Ф — глюкозо-1-фосфат
Г-6Ф — глюкозо-6-фосфат
ГГН — гомогалактуронан
ГР — глутатионредуктаза
ДГА — дегидроаскорбат
ДГАР (**DHAR**) — фермент дегидроаскорбатредуктаза
КГН — ксилогалактуронан
МДГА — монодегидроаскорбат
МДГАР (**MDHAR**) — фермент моногидроаскорбатредуктаза
РГ I — рамногалактуронан I
РГ II — рамногалактуронан II
РС — растворимые сахара
С — сахароза
Сах-6Ф — сахарозо-6-фосфат
Сорб — сорбитол
Сорб-6Ф — сорбитоло-6-фосфат
ТФА — триозофосфат
УДФ-Г — УДФ-глюкоза
ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфат
Фр — фруктоза
Фр-6Ф — фруктозо-6-фосфат
ALase — альдонолактоназа
АО — аскорбатоксидаза
АПО (APX)— аскорбатпероксидаза

DHAR — ген дегидроаскорбатредуктазы
DHAR3 — ген дегидроаскорбатредуктазы
GalDH — L-галактозодегидрогеназа
GalLDH — L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа
GalUR — D-галактуронатредуктаза
GGP — фермент ГДФ-галактозофосфорилаза
GGP — ген ГДФ-L-галактозофосфорилазы
GGP1 — ген ГДФ-L-галактозофосфорилазы
GGP3 — ген ГДФ-L-галактозофосфорилазы
GME — ГДФ-D-манноза-3,5'-эпимераза
GMP — ГДФ-D-маннозопирофосфорилаза
GPP — L-галактозо-1-фосфатфосфатаза
GulLDH — L-гулоно-1,4-лактондегидрогеназа
GulLO — L-гулоно-1,4-лактон-оксидаза
MDHAR — ген монодегидроаскорбатредуктазы
MDHAR1 — ген монодегидроаскорбатредуктазы
MIOX — миоинозитоноксигеназа
PGI — фосфоглюкозоизомераза
PMI — фосфоманномутаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Аскорбиновая кислота (АК), также известная как витамин С, является важным вторичным метаболитом растений, выполняющим множество разнообразных функций в растительных тканях. Она принимает участие в регуляции роста и цветения, вегетативной и репродуктивной дифференциации, влияет на водный обмен и формирование ответа на стрессоры (Mazid et al., 2011; Bilska et al., 2019; Wu et al., 2024). Также АК играет значимую роль в регенерации токоферола и зеаксантина и участвует в регуляции активности фотосистемы II (Smirnoff, 1999). Это объясняет её высокое содержание в хлоропластах и широкое распространение в различных органах растения.

Известно, что содержание АК в разных частях растения неодинаково (Marson, 1953). Например, в кожице плодов содержание АК может быть в несколько раз выше, чем в мякоти (Bassi et al., 2017). Это обусловлено тем, что кожица плодов более подвержена воздействию солнечного света и других стрессовых факторов. Таким образом, накопление АК в кожице плодов представляет собой эффективный механизм защиты плода от оксидативного стресса (Foyer, Noctor, 2011).

Основным путем синтеза АК у большинства растений, включая *Malus domestica* (Suckow) Borkh., считается путь Смирнова–Уилера, в котором метаболитом-предшественником является L-галактоза (Smirnoff, Wheeler, 2000). Однако для растений может существовать несколько дополнительных путей биосинтеза, таких как, например, галактуроновый (путь «подхвата» пектина), а также миоинозитоловый и L-гулозный пути (Smirnoff, Wheeler, 2000; Wolucka, Van Montagu, 2003; Ishikawa et al., 2018; Тяпкина и др., 2019). В каждом из этих биосинтетических путей задействованы разные метаболиты-предшественники синтеза АК: D-глюкоза, L-галактоза, L-галактоно-1,4-лактон в пути Смирнова-Уилера, L-гулоно-1,4-лактон, миоинозитол, — в L-гулозном и миоинозитоловом, D-галактуроновая кислота — в пути «подхвата» пектина.

Содержание АК зависит не только от количества путей синтеза и интенсивности их работы, но и от процесса рециркуляции (рециклинга) АК, осуществляемого в аскорбат-глутатионовом цикле (цикле Фойера–Холливелла–Асады (Horemans, 2000)). Этот сложный метаболический каскад включает в себя последовательные реакции нейтрализации активных форм кислорода (АФК), а также окислительно-восстановительные преобразования АК. Ключевыми ферментами рециркуляции АК на разных этапах развития плодов являются кодируемые одноименными генами монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР) и дегидроаскорбатредуктаза (ДГАР) (Li et al., 2008; Suekawa et al., 2018).

Согласно современным представлениям, у многих плодовых культур, включая *M. domestica*, ключевыми регуляторами рециркуляции АК в плодах являются ген дегидроаскорбатредуктазы (*DHAR*) и соответствующий ему фермент ДГАР. (Mellidou, Kanellis, 2017; Li et al., 2011; Suekawa et al., 2018).

АК играет важную роль в поддержании здоровья человека. Её биологическая значимость обусловлена участием в многочисленных метаболических процессах, включая антиоксидантную защиту, синтез коллагена, регуляцию иммунной системы (Hacisevki, 2009). Однако человеческий организм не способен синтезировать витамин С, что делает его незаменимым нутриентом, поступающим с пищей. Основными источниками АК являются фрукты и овощи, такие как томаты, киви, облепиха (Ohkawa et al., 2009; Елисеева, Мироненко, 2018; Bilska et al., 2019).

В регионах с суровым климатом обеспечение населения свежими фруктами и овощами в течение всего года затруднено. В таких условиях *M. domestica*, обладающая экологической пластичностью, широким сортовым разнообразием и длительным сроком хранения яблок, становится важным источником питательных плодов. Несмотря на низкое содержание АК в плодах *M. domestica*, около 0,04 мг/г сырого веса (Bianchi et al., 2020), регулярное употребление яблок в течение всего года делает их

привлекательной и доступной альтернативой высоковитаминным, но менее доступным источникам витамина С.

Происходящая в настоящее время интенсификация садоводства влечет за собой необходимость быстрого совершенствования целого комплекса функциональных характеристик, как плодовых деревьев, так и самих плодов. Для решения этой задачи всё большую важность приобретают методы адаптивной селекции, направленные на создание сортов, максимально устойчивых к конкретным условиям выращивания и обладающих при этом высокими агробиологическими качествами плодов. Актуальной тенденцией в селекции плодовых культур является скрещивание *M. domestica* с дикими аборигенными видами, несущими полезные признаки.

Для *M. domestica* перспективным донором полезных признаков является *Malus baccata* (L.) Borkh. (яблоня сибирская). Помимо зимостойкости и устойчивости к некоторым грибковым заболеваниям, она отличается крайне высоким содержанием АК в плодах (Fang et al., 2017; Stavitskaya et al., 2023). Гибриды *M. baccata* с *M. domestica* могут частично наследовать эти признаки, в том числе накапливать высокое, более 1 мг/г содержание АК, что делает их плоды важными элементами функционального питания. Однако данные о биохимическом составе, генетических и метаболических особенностях плодов *M. baccata*, фрагментарны и разрознены.

Таким образом, проведение предварительной селекции в отношении *M. baccata*, включающее изучение особенностей биохимического состава плодов, важно как с фундаментальной точки зрения – для выявления особенностей метаболизма АК и углеводов в плодах, так и с практической — для поиска перспективных маркеров для отбора высоковитаминных гибридов.

В связи с этим **целью** данной работы было изучение особенностей синтеза, накопления и рециркуляции аскорбиновой кислоты в тканях плодов *Malus baccata* (L.) Borkh. и её гибридов F1 на разных стадиях развития.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучить динамику накопления АК в тканях кожицы и мякоти *M. baccata* и её гибридов F1 с *M. domestica* на разных стадиях развития плодов.
2. Определить динамику экспрессии ключевых генов пути Смирнова-Уилера — ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*GGPI*, *GGP3*) в тканях плодов по мере их созревания.
3. Определить динамику экспрессии основных генов рециркуляции АК — монодегидроаскорбатредуктазы (*MDHAR1*), дегидроаскорбатредуктазы (*DHAR3*) в тканях плодов по мере их созревания.
4. Проанализировать активность ферментов рециркуляции АК: монодегидроаскорбатредуктазы (МДГАР), дегидроаскорбатредуктазы (ДГАР), аскорбатпероксидазы (АПО) на разных стадиях развития плодов изучаемых генотипов.
5. Изучить динамику накопления предшественников синтеза АК (растворимых сахаров и пектинов) в тканях плодов изучаемых генотипов в процессе созревания плодов.
6. Провести модельный эксперимент («фидинг») для оценки вклада метаболитов-предшественников (D-глюкозы, L-галактозы, L-галактоно-1,4-лактона, L-гулоно-1,4-лактона, миоинозитола, глюкуроновой и галактуроновой кислот) в накопление АК в тканях плодов исследуемых генотипов.

Положения, выносимые на защиту:

1. *M. baccata* (L.) Borkh. имеет отличную от *M. domestica* (Suckow) Borkh. стратегию накопления АК в плодах. В тканях *M. baccata* высокое содержание АК наблюдается уже на ранней стадии развития и продолжает увеличиваться до стадии зрелости, в то время как в тканях *M. domestica* на ранней стадии наблюдается низкое содержание АК и остается таковым до стадии зрелости.
2. Высокое содержание АК в тканях плодов *M. baccata* (L.) Borkh. обеспечивается высокой активностью фермента МДГАР, высоким уровнем

экспрессии генов *GGP* и *MDHAR1*, и наличием дополнительных путей синтеза АК – миоинозитолового и галактуринового.

Научная новизна. Впервые изучена динамика накопления АК в тканях *M. baccata* и её гибридов F1 на разных стадиях развития плодов: впервые определена относительная экспрессия генов *GGP1*, *GGP3*, *MDHAR1*, *DHAR3*, изучена активность ферментов МДГАР, ДГАР, АПО, динамика накопления растворимых углеводов и пектинов при прохождении стадий развития плодов. Впервые установлено, что *M. baccata* имеет отличную от *M. domestica* стратегию накопления АК в плодах — увеличение содержания АК происходит уже на ранней стадии развития плода и продолжается до стадии зрелости. При этом к зрелости плодов *M. baccata* определяющее значение для накопления АК приобретает работа генов и ферментов системы рециркуляции.

Показано, что в результате скрещивания *M. baccata* с *M. domestica* в плодах гибридов происходило снижение содержания АК. Тем не менее, её содержание в плодах таких гибридов превышало аналогичный показатель в плодах *M. domestica*, при этом уменьшалось число возможных метаболических путей синтеза АК и изменялась их локализация в тканях. На основании полученных результатов предложен перспективный ген-кандидат *MDHAR1* для маркерной селекции в целях получения плодов яблони с высоким содержанием АК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение для понимания особенностей путей биосинтеза и рециркуляции АК в тканях плодов *M. baccata* и её гибридов F1 с *M. domestica*.

Увеличение активности фермента МДГАР, сопровождаемой повышенной экспрессией генов *MDHAR1* и *GGP1*, может служить маркером высокого содержания АК плодах яблони. Тестирование плодов на наличие таких маркеров может значительно сократить процесс предварительного отбора и ускорить процесс выведения новых сортов яблони.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio 2019» (Кольцово, 22–24 октября 2019 г.), IV Всероссийской конференции с международным участием «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Удэ, 15–18 июня, 2021 г.), III Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии (Листвянка, 21 августа – 3 сентября 2022 г.), VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» (Большое Голоустное, 3–7 июля, 2023 г.), VIII Международной научной конференции «Проблемы изучения растительного покрова Сибири» (Томск, 24–27 сентября (2025 г)).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ (входящие в базы Web of Science и Scopus).

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 213 наименований, в том числе 186 на иностранном языке. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков и 10 таблиц. Работа выполнена в лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск).

Личный вклад автора. Диссертация написана автором самостоятельно. В работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками лабораторий ФБАР, ФХМИ, ФГ и отдела биоразнообразия и биологических ресурсов СИФИБР СО РАН. Автор

лично принимал участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: планирования и проведения экспериментов, статистической обработки данных, обобщения и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы, апробациях на конференциях.

Благодарности. Автор выражает глубокую и сердечную благодарность научному руководителю работы к.б.н. Е.Г. Рудиковской за помощь при планировании лабораторных экспериментов, обработке, анализе первичных экспериментальных результатов и важные замечания при написании рукописи. Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Л.В. Дударевой за методическую помощь в организации лабораторных экспериментов и ценные рекомендации при написании рукописи. Автор благодарит к.б.н. А.В. Рудиковского за предоставление материала для исследования, методическую помощь, участие в организации и проведении экспериментов, помощь в обработке и анализе экспериментальных результатов и рекомендации при написании рукописи. Автор благодарит д.б.н. С.В. Осипову за методическую помощь, участие в организации и проведении экспериментов и ценные рекомендации при написании рукописи. Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. А.И. Катышеву, к.б.н. И.В. Федосеевой за помощь в организации и проведении экспериментов и ценные рекомендации. Автор выражает признательность к.б.н. Д.А. Кривенко за ценные замечания. Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений СИФИБР СО РАН и всем сотрудникам лаборатории физико-химических методов исследований СИФИБР СО РАН и за помощь в работе и доброжелательное отношение.

Автор сердечно благодарен своей семье за всестороннюю поддержку при написании рукописи.

Работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 20-016-00091 А в рамках государственных

заданий: № гос. регистрации – 121031300009-4, 122041100049-0, Рег. №
ННЮКТР – 125021902487-9.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аскорбиновая кислота

АК является одним из самых распространенных и многофункциональных соединений в растительных тканях. Она обнаруживается во всех клеточных компартментах, при этом её содержание в хлоропластах может достигать 20 мМ (Gest et al., 2013).

Согласно современным данным, АК играет важную роль в процессе фотосинтеза, участвуя в пероксидазной реакции Мелера наряду с аскорбатпероксидазой, регулируя окислительно-восстановительное состояние переносчиков электронов. Она служит кофактором виолаксантинооксидазы, фермента, который участвует в ксантофилловом цикле и обеспечивает фотозащиту (Paciolla et al., 2019). АК также принимает участие в процессе синтеза этилена, гиббереллинов и антоцианов и таким образом влияет на регуляцию клеточного роста (Mazid et al., 2011; Zhang, 2012; Smirnoff, 2018; Bilska et al., 2019; Wu et al., 2024). Высокая активность аскорбатоксидазы в клеточной стенке наблюдается на участках быстрого растяжения клеток (Paciolla et al., 2019).

АК в растениях может синтезироваться несколькими путями. Основным путем биосинтеза АК в тканях растений считается путь Смирнова-Уилера (Wheeler et al., 1998; Smirnoff, 2018). Наличие иного доминирующего пути синтеза АК является видоспецифичным (Smirnoff, Wheeler, 2000; Hancock, Viola, 2005). Предполагается, что у разных растений также может существовать несколько дополнительных путей биосинтеза, таких как, например, L-галактозный путь (путь «подхвата» пектина). Эти пути вносят меньший вклад в содержание АК в растениях (Smirnoff, Wheeler, 2000; Тяпкина и др., 2019).

Недавние исследования продемонстрировали, что АК является ключевым компонентом во взаимоотношениях «растение — окружающая среда» (Paciolla et al., 2019). Изменения в окружающей среде, которые

приводят к окислению или деградации запасов АК, являются важными сигналами, позволяющими растениям корректировать свои метаболические процессы. Таким образом, изучение роли АК в растительных тканях является критически важной научной проблемой.

Комплексное исследование функций АК в растениях представляет собой стратегически значимую задачу, охватывающую как фундаментальные аспекты физиологии и биохимии растений, так и прикладные вопросы селекции и агротехнологии. В рамках фундаментальных исследований необходимо углубленное изучение метаболических путей, в которых участвует АК, а также её роли в окислительно-восстановительных реакциях, антиоксидантной защите и регуляции клеточных процессов. Прикладные аспекты данной проблемы включают разработку инновационных методов селекции, направленных на создание сортов растений с повышенной устойчивостью к абиотическим стрессорам. Генетическая модификация растений с целью оптимизации синтеза и аккумуляции АК может стать ключевым элементом в стратегии повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур в условиях изменяющегося климата (Sedov, 2014; Макаренко, 2019).

1.1. История исследования путей биосинтеза аскорбиновой кислоты

Первые исследования биосинтеза АК начались в 1950-х годах. В этих исследованиях было показано превращение гексозы в АК в тканях растений (Loewus, 1963). Проводимые в это же время исследования биосинтеза АК у животных показали, что животные могут превращать D-глюкуронат в L-гулоно-1,4-лактон, который впоследствии окислялся до АК (Burns, 1967). Необходимо отметить, что этот путь биосинтеза включал в себя инверсию углеродной цепи, которая подтверждалась в экспериментах с кормлением крыс меченными глюкозой и гулонолактоном. Было выяснено, что растения способны превращать производные D-галактуронової кислоты и L-галактоно-1,4-лактон в АК (Mapson et al., 1954; Isherwood, Mapson, 1962). Однако

попытки провести аналогичный опыт со специфически мечеными гексозами показали, что при их превращении инверсии углеродной цепи не происходило. В связи с этим был предложен альтернативный путь биосинтеза, при котором глюкоза превращалась непосредственно в АК с помощью D-глюкозона и L-сорбозона (Loewus, 1990). Хотя меченые глюкозон и сорбозон превращались в АК, скорость превращения сорбозона в АК была не выше, чем у глюкозы (Saito et al., 1990). Ни один из исследуемых субстратов не показал статистически значимого повышения уровня содержания АК в растениях при их экзогенном введении (Conklin et al., 1997; Pallanca, Smirnoff, 1999), несмотря на то, что была обнаружена дегидрогеназа, способная превращать L-сорбозон в АК (Loewus et al., 1990).

Эксперименты на других видах растений и грибов не подтвердили предположение об участии L-сорбозона и D-глюкозона в биосинтетическом цикле АК (Pallanca, Smirnoff, 1999). Напротив, L-галактоно-1,4-лактон, при экзогенном введении, значительно увеличивал концентрацию АК в растениях (Davey et al., 1999), а меченый L-галактоно-1,4-лактон очень быстро и полностью превращался в АК (Baig et al., 1970). Исходя из результатов этих экспериментов, был сделан вывод, что L-галактоно-1,4-лактон является чрезвычайно эффективным предшественником в цикле синтеза АК.

В 1996 году описание мутанта *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с дефицитом АК побудило к возобновлению исследований в этой области (Smirnoff et al., 2001). Спустя почти 40 лет был предложен путь биосинтеза в растениях, при котором АК образуется из глюкозы/маннозы с помощью L-галактоно-1,4-лактона, но без инверсии углеродной цепи (Wheeler et al., 1998). Этот путь получил название пути Смирнова–Уилера.

1.2. Биосинтез аскорбиновой кислоты

В настоящее время метаболические пути, поддерживающие необходимый для растения уровень АК в клетках, условно разделяют на три категории: пути биосинтеза, пути деградации и пути рециркуляции (Fenech et

al., 2019). Известно, что существует 4 пути биосинтеза АК: L-галактозный, D-галактуроновый, миоинозитольный и L-гулозный (рис. 1). Они изучены в плодах таких растений как, например, клубника и киви (Foyer et al., 2020; Liao et al., 2021; Liu et al., 2022).

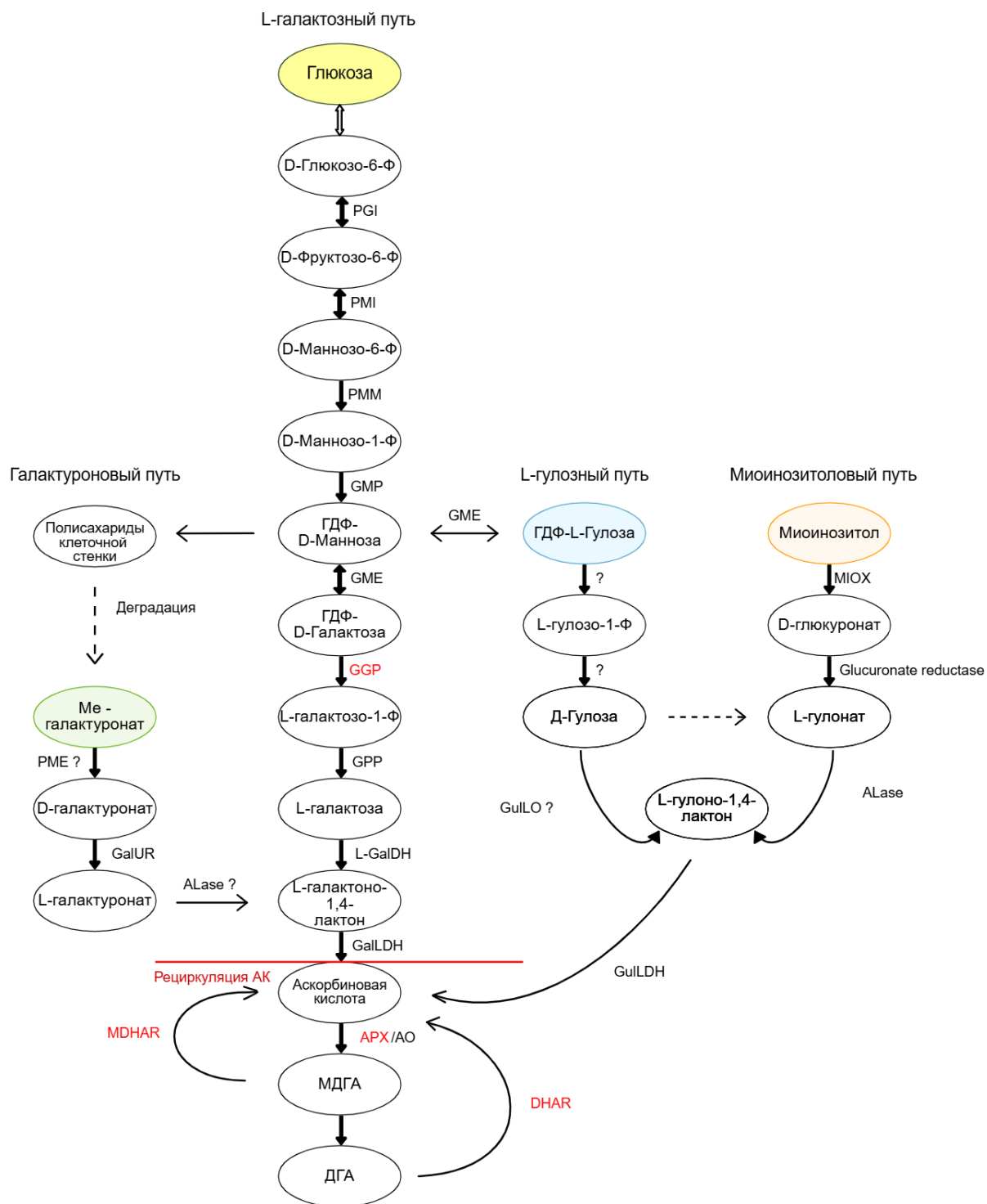


Рисунок 1. Схема путей биосинтеза аскорбиновой кислоты в растительных тканях (Mellidou et al., 2012; Suekawa et al., 2017; Smirnoff, Wheeler, 2024) с

модификациями автора. Примечание: Ферменты, задействованные на разных путях биосинтеза и рециркуляции АК: PGI — фосфоглюкозоизомераза, PMI — фосфоманноизомераза, фосфоманномутаза, GMP — ГДФ-D-маннозопирофосфорилаза, GME — ГДФ-D-манноза-3,5'-эпимераза, GGP — ГДФ-галактозофосфорилаза, GPP — L-галактозо-1-фосфатфосфатаза, GalDH — L-галактозодегидрогеназа, GalLDH — L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа, APX — аскорбатпероксидаза, AO — аскорбатоксидаза, MDHAR — монодегидроаскорбатредуктаза, DHAR — дегидроаскорбатредуктаза, GalUR — D-галактуронатредуктаза, ALase — альдонолактоназа, GulLO — L-гулоно-1,4-лактон-оксидаза, GulLDH — L-гулоно-1,4-лактондегидрогеназа, MIOX — миоинозитолоксигеназа, Glucuronate reductase — глюкуронатредуктаза.

L-галактозный путь синтеза. В настоящее время путь Смирнова–Уилера (Wheeler et al., 1998) считается основным путем биосинтеза АК в растениях. Он состоит из десяти последовательных стадий.

Исходным субстратом L-галактозного пути выступает молекула D-глюкозы. Стоит отметить, что первые шесть стадий нужны для того, чтобы преобразовать D-глюкозу в L-галактозу (Linster et al., 2008; Тяпкина и др., 2019). Важными метаболитами данного пути являются ГДФ-D-манноза и ГДФ-L-галактоза. ГДФ-D-манноза также расходуется растением на биосинтез полисахаридов клеточной стенки. Регуляторной точкой данного пути считается реакция превращения ГДФ-L-галактозы в L-галактозо-1-фосфат, которая приводит непосредственно к синтезу L-аскорбиновой кислоты и опосредована работой фермента ГДФ-L-галактозофосфорилазы (GGP) (EC 2.7.7.69.). Стоит отметить, что ее активность зависит от наличия у клетки потребности в полисахаридах клеточной стенки (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2023).

L-галактозо-1-фосфат превращается в L-галактозу с помощью фермента галактозо-1-фосфатфосфатазы (GPP) (EC 3.1.3.93). L-галактоза затем преобразуется в галактоно-1,4-лактон с помощью НАД-зависимой галактозодегидрогеназы (GalDH) (EC 1.1.1.360). Галактоно-1,4-лактон служит непосредственным предшественником L-аскорбиновой кислоты и окисляется

до АК L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой (GalLDH) (EC 1.3.2.3). Она располагается на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий (Matos et al., 2022). Хотя начальные этапы этого пути протекают в цитозоле, окисление галактоно-1,4-лактона с помощью цитохрома C в митохондриях позволяет предположить интеграцию биосинтеза АК с энергетическим метаболизмом и окислительно-восстановительным состоянием клетки (Matos et al., 2022).

D-Галактуроновый путь синтеза. Начальными субстратами в D-галактуроновом пути являются продукты разрушения полисахаридов клеточной стенки, например, такие как галактуроновая кислота. Она служит ключевым элементом для двух процессов: синтеза пектинов и биосинтеза АК.

Галактуроновый путь состоит из четырёх стадий, которые включают в себя восстановление D-галактуроновой кислоты галактуронатредуктазой (GalUR) (EC 1.1.1.19) до L-галактоновой кислоты или L-галактоно-1,4-лактона с последующим образованием АК. Сверхэкспрессия гена галактуронатредуктазы в клубнике приводила к увеличению активности соответствующего фермента в 10–50 раз и, соответственно, к увеличению содержания АК в 2–3 раза (Agius et al., 2003; Upadhyaya et al., 2009). В некоторых исследованиях было показано, что стресс, вызванный дефицитом железа, индуцировал экспрессию гена GalUR в листьях яблони (Liao et al., 2023), однако этот ген не принимал участие в синтезе АК в листьях (Li et al., 2009).

В апопласте, в присутствии ионов Cu^{2+} , АК может способствовать образованию гидроксильных радикалов. Они, в свою очередь, могут способствовать неферментативному расщеплению пектинов клеточной стенки на этапе созревания плодов, что ведёт к её размягчению (Dumville, Fry, 2003; Wang et al., 2018; Smirnoff, Wheeler, 2024).

Галактуроновый путь является основным путём биосинтеза в плодах шиповника Роксбурга (An et al., 2007), плодах винограда (Cruz-Rus et al., 2010). Также этот путь был обнаружен в плодах киви (Li et al., 2011) и яблони (Mellidou et al., 2012) как дополнительный путь синтеза. Предположительно,

он может быть активным в некоторых тканях на определенных стадиях развития растения.

Ввиду того, что галактуроновый путь синтеза значительно короче L-галактозного, который считается основным метаболическим путем синтеза АК у большинства исследованных растений, предполагается, что галактуроновый путь может активироваться в ответ на воздействие стрессоров для быстрого увеличения содержания АК (Cruz-Rus et al., 2011). Косвенным подтверждением этой гипотезы является то, что АК способна разрушать пектин клеточных стенок неферментативным путем (Dumville, Fry 2003; Arancibia, 2006; Arabia et al., 2024).

Гулозный и миоинозитоловый пути синтеза. В гулозном пути ГДФ-D-манноза с помощью фермента ГДФ-D-маннозоэпимеразы превращается в ГДФ-L-гулозу. Дальнейшие превращения связаны с синтезом L-гулоно-1,4-лактона и его окислением до АК (Smirnoff, Wheeler, 2024). Этот путь наименее изучен. Он был обнаружен в клетках *A. thaliana* (Wolucka, Van Montagu, 2003).

Миоинозитоловый путь биосинтеза АК в растениях состоит из 5-ти стадий. На первой стадии миоинозитол-1-фосфат, превращается в миоинозитол. На второй миоинозитол окисляется до глюкуроната. На третьей стадии глюкуронат при помощи глюкуронатредуктазы преобразуется в гулоновую кислоту. Гулоновая кислота с помощью альдонолактоназы преобразуется в гулоно-1,4-лактон, который затем превращается в АК.

1.3. Рециркуляция аскорбиновой кислоты

Содержание АК в клетках зависит не только от степени активности биосинтетических путей, но и от её рециркуляции (Liu et al., 2015; Mellidou, Kanellis, 2017).

Аскорбат-глутатионовый цикл или путь Фойера–Холливелла–Асады (рис. 2) (Noremans et al. 2000) в растениях представляет собой сложный биохимический каскад, в ходе которого происходит нейтрализация активных форм кислорода, таких как перекись водорода. В растительной клетке процесс

рециркуляции АК осуществляется с помощью нескольких ферментов, таких как аскорбатпероксидаза (АПО; ЕС 1.11.1.11), реже аскорбатоксидаза (АО; ЕС 1.10.3.3.), монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР; ЕС 1.11.1.11), дегидроаскорбатредуктаза (ДГАР; ЕС 1.8.5.1), глутатионредуктаза (ГР; ЕС 1.8.7.1) (Suekawa et al., 2018).

На первой стадии этого пути H_2O_2 восстанавливается до воды аскорбатпероксидазой, реже аскорбатоксидазой. В ходе реакции происходит окисление АК до монодегидроаскорбата (МДГА), который затем может быть восстановлен до АК или окислен до дегидроаскорбата (ДГА). В свою очередь ДГА может быть восстановлен до АК с помощью дегидроаскорбатредуктазы. Кофактором дегидроаскорбатредуктазы является восстановленный глутатион, который окисляется в результате восстановления ДГА до АК. Окисленный глутатион восстанавливается с помощью глутатионредуктазы. В процессе восстановления монодегидроаскорбата и глутатиона происходит окисление НАДФН.

Будучи нестабильной молекулой дегидроаскорбат может подвергнуться необратимому гидролизу до 2,3-дикето-1-гулоната (ДКГ) или катаболизироваться до щавелевой, L-винной или L-треоновой кислоты (Buettner, Schafer, 2000; Dewhirst, Fry, 2018).

Восстановление дегидроаскорбата также может быть неферментативным или катализироваться белками с активностью дегидроаскорбатредуктазы, такими как глутатион S-трансфераза омега-1 или глутаредоксины (Martinez, Araya, 2010; Navyashree, 2024). АК и глутатион также способны напрямую взаимодействовать с активными формами кислорода, нейтрализуя их (Meister, 1992; Pandhair, Sekhon, 2006).

Таким образом, помимо общего уровня содержания АК, для эффективной защиты растений критически важным является баланс окислительно-восстановительных форм АК, который определяется активностью соответствующих ферментов.

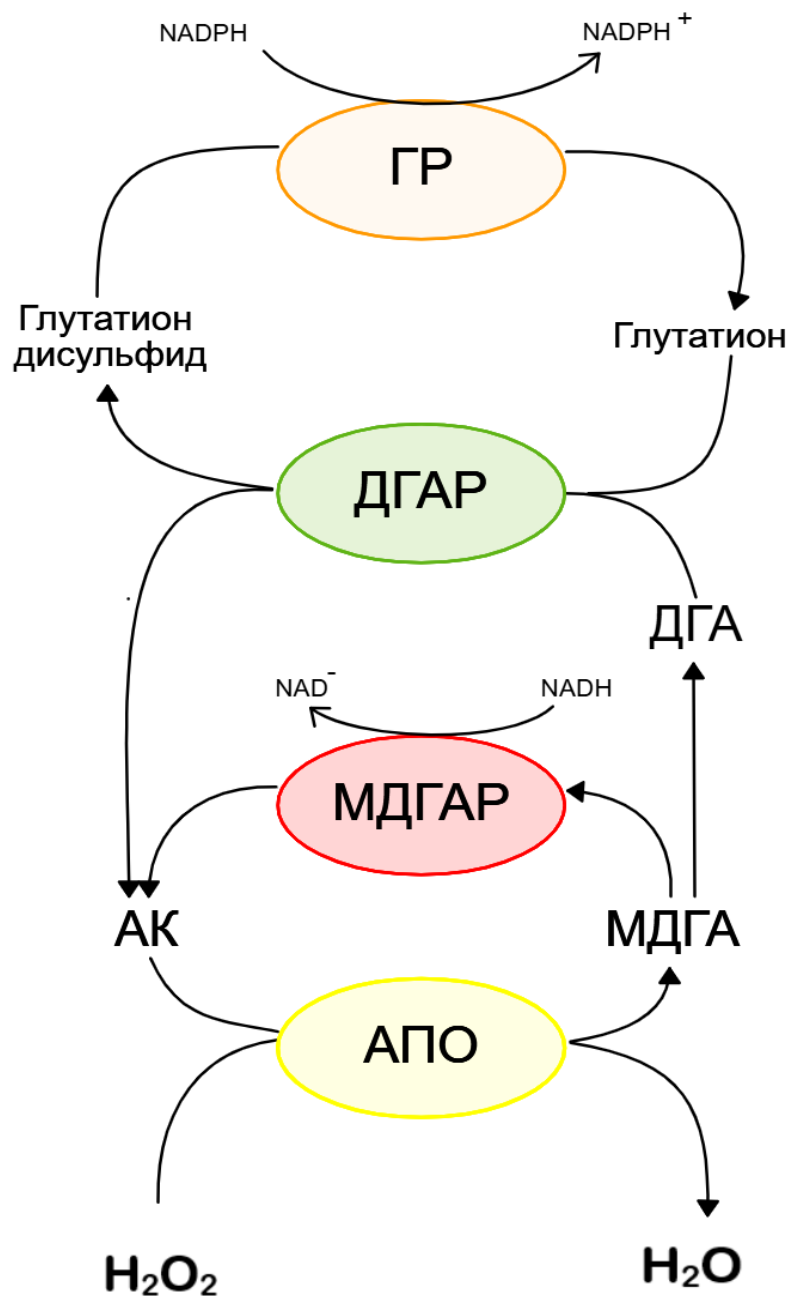


Рисунок 2. Схема аскорбат-глутатионового цикла (Mellidou et al., 2012; Тяпкина и др., 2019) с модификациями автора. Примечание: АПО — аскорбатпероксидаза, МДГАР — монодегидроаскорбатредуктаза, ДГАР — дегидроаскорбатредуктаза, ГР — глутатионредуктаза, АК — аскорбиновая кислота, МДГА — монодегидроаскорбат, ДГА — дегидроаскорбат.

В растениях аскорбат-глутатионовый цикл протекает в хлоропластах, митохондриях, пластидах, цитозоле и пероксисомах (Pang, Wang, 2010; Foyer,

Kunert, 2024). Поскольку глутатион, АК и НАДФН присутствуют в растительных клетках в высоких концентрациях, предполагается, что аскорбат-глутатионовый цикл, наряду с каталазой, играет ключевую роль в детоксикации H_2O_2 .

Важная роль генов рециркуляции *MDHAR* и *DHAR* в регуляции содержания АК была продемонстрирована в экспериментах с трансгенными растениями, у которых увеличение экспрессии *DHAR* и *MDHAR* приводило к увеличению содержания АК (Haroldsen et al., 2011; Li et al., 2012). В геноме *A. thaliana* были описаны пять паралогов гена *DHAR* (Mittler et al., 2004; Zhang et al., 2015). Экспрессия нескольких из них была индуцирована после воздействия на растения низкими или высокими температурами и интенсивным светом (Mittler et al., 2004). В плодах яблони *DHAR* регулирует уровень восстановленного аскорбата (Mellidou et al., 2012). По-видимому, функции разных ортологов семейства генов аскорбат-глутатионового цикла возникли в ответ на различные абиотические стрессы у разных видов растений (Liu et al., 2012; Jardim-Messeder et al., 2022). Активность ферментов рециклинга может быть связана не только с содержанием АК. Например, в некоторых исследованиях было выявлено, что активность *MDHAR* положительно коррелировала как с содержанием АК, так и с твердостью плодов (Stevens et al., 2008).

1.4. Содержание аскорбиновой кислоты и её локализация в клетках и тканях растений

Эволюционно уровень АК увеличивался от эукариотических водорослей и мхов (0,1–1,0 ммоль/л) (Gest et al., 2013) до высших растений (3–45 ммоль/л), приобретая роль центрального антиоксиданта клетки в аэробных условиях существования (Gest et al., 2013).

Многофункциональность и распространенность АК в клеточных компартментах влекут за собой необходимость быстрой и точной регуляции ее содержания. Это достигается путем активации различных механизмов на

разных уровнях, например, таких как регуляция экспрессии генов, модуляция активности ферментов, участвующих не только в биосинтезе и деградации, но и в рециркуляции АК (Wang, Zhang, 2013; Gallie, 2013; Wu et al., 2024). Помимо этого, значимую роль играют внутриклеточный и межклеточный транспорт АК, способствуя поддержанию её концентрации в каждой органелле и ткани (Zechmann et al., 2011).

Содержание АК в тканях растений может варьировать в зависимости от множества факторов, таких как: тип ткани, возраст растения, время суток для отбора проб, интенсивность освещения и др. (Hamner et al., 1945; Bilska et al., 2019; Davey et al., 2000; Zhang, 2012).

Известно, что АК в основном накапливается в фотосинтезирующих органах и тканях, однако, её накопление в высокой концентрации наблюдается и в некоторых нефотосинтезирующих тканях, преимущественно в плодах (Liao et al., 2023). Как правило, плодовые культуры можно разделить на три типа в зависимости от периодов максимального накопления АК в фазы роста и развития плодов (Liao et al., 2023). Первый тип — это культуры, в плодах которых пик накопления АК наблюдается в ювенильный период развития плодов. К таким относится, например, *M. domestica* (Li et al., 2008). Второй тип отличается пиком накопления АК в период роста плодов. К такому типу накопления принадлежит, например, зизифус (Wang et al., 2022). Третий тип характеризуется накоплением максимального уровня содержания АК в период созревания плодов. К таким относятся клубника (Luo et al., 2019) и томаты (Ioannidi et al., 2009; Mellidou et al., 2021).

Содержание АК также различается и в клеточных органеллах. Цитоплазма и пероксисомы содержат высокие уровни АК, приблизительно 20–40 ммоль и 10–23 ммоль соответственно (Zechmann, 2011). Меньшее содержание имеют ядро (6–30 ммоль), хлоропласты (10–20 ммоль), митохондрии (9–12 ммоль). Самое низкое содержание АК регистрируется в вакуолях, приблизительно 2–4 ммоль (Zechmann, 2011).

Учитывая, что заключительный ферментативный этап в первичном пути биосинтеза АК происходит в митохондриях, значительная часть синтезируемого АК обнаруживается в этих органеллах. Однако следует отметить, что содержание АК в митохондриях ниже, чем в цитоплазме (Horemans et al., 2000). Это позволяет предположить, что АК выходит из митохондрий через специальные транспортеры после синтеза. Было установлено, что транспорт АК через хлоропластную и плазматическую мембраны опосредован специфическими белковыми переносчиками, о чем сообщают Horemans et al. (2000) и Szarka et al. (2007). Механизмы транспорта АК через митохондриальную и пероксисомальную мембраны остаются неясными, хотя возможно, что АК может поступать из митохондрий в цитоплазму при помощи простой диффузии.

Примечательно, что в апопласте отсутствуют необходимые компоненты, такие как НАДФН, глутатион и соответствующие ферменты, необходимые для рециркуляции АК. Можно предположить, что для поддержания нужного уровня АК между симпластически разделенными клетками и тканями должны существовать транспортеры для АК и дегидроаскорбиновой кислоты.

1.5. Дальний транспорт аскорбиновой кислоты

Содержание АК в различных тканях широко варьирует и зависит как от типа ткани, так и от стадии ее развития. Так, например, фотосинтезирующие и запасующие ткани обычно содержат большее количество АК; для молодых и развивающихся тканей характерно более высокое содержание, чем для уже сформировавшихся тканей. Например, в исследованиях яблони сорта «Гала» было показано, что содержание АК в зрелых листьях было выше, чем в молодых, а в кожице содержание АК было выше, чем в мякоти (Li et al., 2008).

Кроме того, содержание АК в различных тканях зависит от сорта одного и того же вида. (Liao et al., 2021). В связи с этим, существует гипотеза «source–to–sink» (гипотеза «источник — сток»), согласно которой накопление АК в плодах может быть связано с переносом АК, синтезированной в других тканях

в виде дегидроаскорбата (Li et al., 2008). Согласно исследованиям (Hancock et al., 2003), синтез АК может происходить и во флоэме. Однако другие авторы показали, что при переносе от органов-источников к органам-акцепторам АК транспортируется избирательно, и точный механизм «выбора» органа или ткани пока неизвестен (Franceschi, Tarlyn, 2002).

2. Предшественники синтеза АК

2.1. Растворимые сахара

Необходимо отметить, что синтез АК также зависит от синтеза некоторых растворимых углеводов. Так, например, первым звеном в пути Смирнова-Уилера является глюкоза.

Растворимые сахара (РС) являются важными компонентами растительных тканей. Углеводный состав растений включает в себя широкий спектр простых сахаров, таких как моно- и дисахариды, сахарных спиртов, полимеров, например, пектинов и целлюлозы (Tharanathan et al., 1987). Их образование происходит в листьях под воздействием солнечного света в результате процесса фотосинтеза (Atkin et al., 2000). Оттуда по флоэме транспортные формы растворимых сахаров (такие как сахароза и сорбитол) распространяются по всему растению и поступают в вегетативные и генеративные органы, где происходит их дальнейший метаболизм.

Транспортные формы сахаров могут преобразовываться в запасающие формы, такие как фруктоза и глюкоза (Bhatla, Lal, 2023); участвовать в образовании полимерных компонентов клеточной стенки, таких как пектины и целлюлоза (Reiter, Vanzin, 2001); конвертироваться в другие соединения в зависимости от потребностей растения (Ishikawa, Dowdle, Smirnoff, 2006) и принимать участие в прочих биохимических процессах (Rosa et al., 2009; Eveland, Jackson, 2012; Ciereszko, 2018).

В рамках метаболических процессов часть растворимых сахаров участвует в различных биохимических реакциях, часть аккумулируется в

вакуолях. В условиях снижения фотосинтетической активности растения задействуют эти запасы для поддержания метаболического транспорта РС в поглощающие органы, например, плоды (Stumpf et al., 2012).

РС также выполняют сигнальную функцию. Так, например, они задействованы в регуляции развития плодов (Rosa et al., 2009; Eveland, Jackson, 2012). Транспорт РС синергически опосредуется транспортерами из разных суперсемейств, которые тонко настроены на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (Chen et al., 2021).

Метаболизм и транспорт растворимых сахаров. Растворимые сахара лежат в основе первичного метаболизма растений (рис. 3) (Patrick et al., 2013). Стоит отметить, что у разных плодовых культур процессы биосинтеза и транспорта сахаров отличаются. Основной транспортной формой РС у большинства растений служит сахароза (Lemoine, 2000). У некоторых видов растений, помимо сахарозы, транспортными формами РС также могут быть раффинозоподобные олигосахариды и сахарные спирты, например, сорбитол (Noiraud et al., 2001). В яблоне и других плодовых деревьях семейства розоцветных транспортными формами растворимых сахаров являются сорбитол и сахароза (рис. 3) (Ishikawa et al., 2006). На долю сорбитола приходится до 60–80% всех фотосинтетических продуктов, образующихся в листьях яблони (Bialeski, 1969; Escobar-Gutiérrez, Gaudillere, 1996). В листьях сорбитол синтезируется из глюкозо-6-фосфата в два этапа (Teo et al., 2006). Загрузка сорбитола и сахарозы во флоэму у яблони является пассивной и идет по симпластному пути (Reidel et al., 2009). Разгрузка же флоэмы в плодах идет по апопластному пути (Zhang et al., 2004; Ma et al., 2019). После высвобождения из флоэмы сорбитол попадает в цитозоль клеток паренхимы с помощью переносчиков сорбитола, связанных с плазматической мембраной. Затем он преобразуется во фруктозу с помощью сорбит-дегидрогеназы (Zhang et al., 2004). Сахароза же либо непосредственно поступает в клетки паренхимы с помощью транспортеров сахарозы, либо преобразуется в глюкозу и фруктозу

The diagram illustrates the metabolic pathways of sugar and starch in a plant cell, showing the transition from a leaf to an apple.

Left Side (Leaf): A yellow sun icon labeled "hv" indicates light energy. The leaf contains a metabolic pathway starting from "ТФА" (TFA) at the bottom, which is converted to "ФДФ" (FDP). FDP is then converted to "Фр-6Ф" (Fructose-6-phosphate). From Fructose-6-phosphate, the pathway branches into "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) and "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate). Glucose-1-phosphate is converted to "УДФ-Г" (UDP-Glucose), which is then used to synthesize "Сахароза" (Sucrose). Glucose-6-phosphate is converted to "Сорб-6Ф" (Sorbitol-6-phosphate), which is then converted to "Сорбитол" (Sorbitol). A red arrow points from the leaf to the apple, indicating the transport of sorbitol.

Right Side (Apple): The apple is shown with a green leaf. The internal structure is divided into "Цитозоль" (Cytosol) and "Вакуоль" (Vacuole). In the cytosol, "Сорб" (Sorbitol) is converted to "Г" (Glucose) and "Фр" (Fructose). These are then converted to "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate) and "Фр-6Ф" (Fructose-6-phosphate). The pathway continues through "УДФ-Г" (UDP-Glucose) and "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) to "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate). The "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate) is then converted to "АДФ-Г" (ADP-Glucose), which is used to synthesize "Крахмал" (Starch) in the "Амиллопласт" (Amyloplast). The "Г" (Glucose) and "Фр" (Fructose) are also converted to "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate) and "Фр-6Ф" (Fructose-6-phosphate) respectively, which are then converted to "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) and "Фр-1Ф" (Fructose-1-phosphate). The "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) is then converted to "АДФ-Г" (ADP-Glucose), which is used to synthesize "Крахмал" (Starch). The "Фр-1Ф" (Fructose-1-phosphate) is then converted to "АДФ-Г" (ADP-Glucose), which is used to synthesize "Крахмал" (Starch). The "Г" (Glucose) and "Фр" (Fructose) are also converted to "Г-6Ф" (Glucose-6-phosphate) and "Фр-6Ф" (Fructose-6-phosphate) respectively, which are then converted to "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) and "Фр-1Ф" (Fructose-1-phosphate). The "Г-1Ф" (Glucose-1-phosphate) is then converted to "АДФ-Г" (ADP-Glucose), which is used to synthesize "Крахмал" (Starch). The "Фр-1Ф" (Fructose-1-phosphate) is then converted to "АДФ-Г" (ADP-Glucose), which is used to synthesize "Крахмал" (Starch).

Ключевую роль в метаболизме растворимых сахаров в органах-акцепторах выполняет субстратный сахарозный цикл, называемый также холостым циклом (Nguyen-Quoc, Foyer, 2001). Он включает в себя следующие стадии: расщепление сахарозы инвертазой и сахарозосинтазой; фосфорилирование образующихся гексоз и взаимопревращение между гексозофосфатами и УДФ-глюкозой, а также повторное образование сахарозы с помощью сахарозо-6-фосфатсинтазы и сахарозо-6-фосфатфосфатазы.

Эта цикл связывает метаболизм растворимых сахаров со многими другими метаболическими путями, такими как гликолиз, синтез крахмала и целлюлозы. Также холостой цикл связан с системой транспортировки растворимых сахаров в тонопласт. Кроме того, он имеет важное значение при распределении РС между метаболическими процессами, происходящими в цитозоле, и их накоплением в вакуолях (Nguyen-Quoc, Foyer, 2001). Однако механизм регулирования транспорта и сахарозного цикла в ответ на изменение поступления сорбитола и сахарозы в плоды остается невыясненным.

Развитие плодов яблони и его связь с метаболизмом растворимых сахаров. Период развития плодов яблони от момента цветения до достижения полной зрелости составляет в среднем 150 дней (Janssen et al., 2008). На протяжении развития плод (яблоко) проходит ряд физиологических стадий (рис. 4).

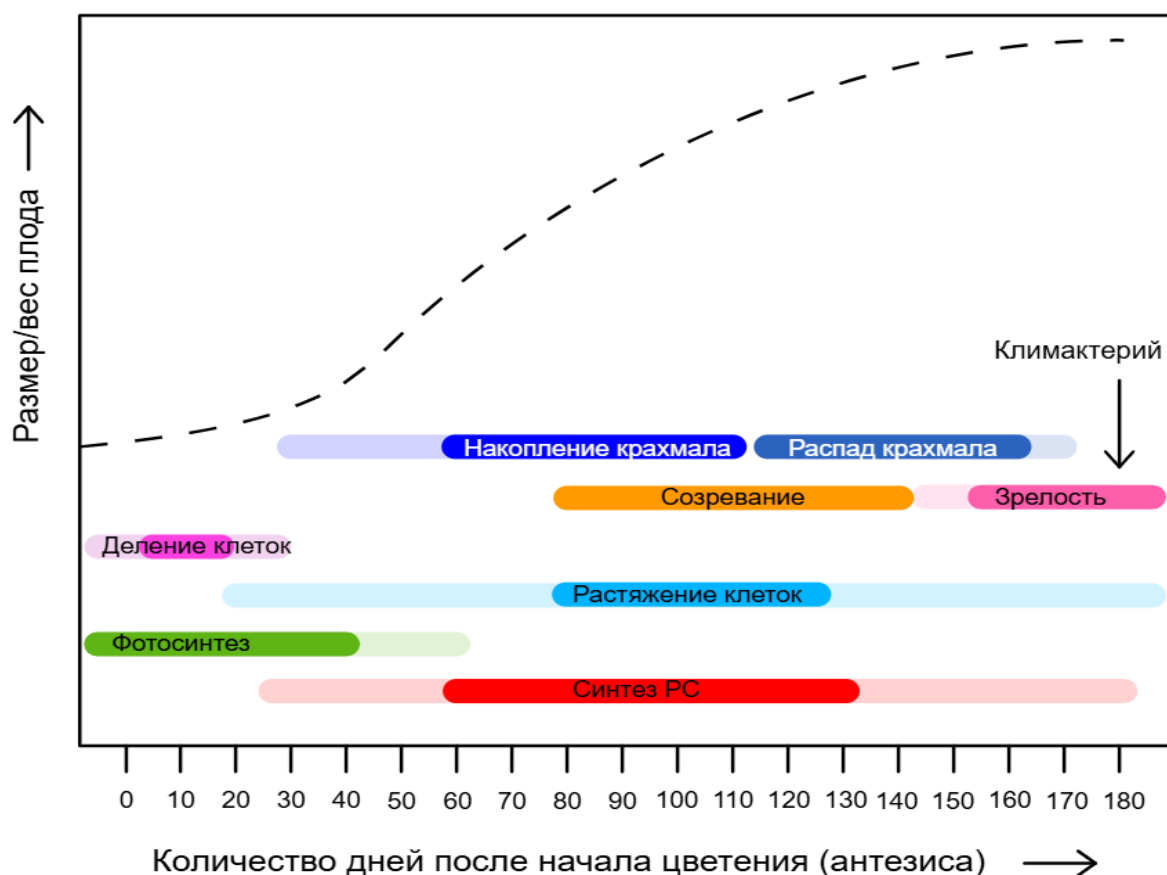


Рисунок 4. Схема стадий развития плодов яблони и связанных с ними метаболических процессов (Tijero et al., 2021) с изменениями.

Первая стадия — стадия пролиферации клеток. За ней следует стадия роста клеток. Она частично совпадает со стадией пролиферации и продолжается до момента биологической зрелости. Третьей является стадия созревания, во время которой в плоде происходят соответствующие биохимические и структурные изменения. Последней, четвертой идет стадия зрелости — заключительный этап в развитии плода (Eccher et al., 2014; Malladi, 2020; Tao et al., 2020). Следует отметить, что на ранних стадиях развития плоды яблони имеют фотосинтетическую систему с активными хлоропластами (Blanke, Lenz, 1989; Garrido et al., 2023). Фотосинтетические пигменты обнаруживаются как в кожице, так и в мякоти плодов, при этом в мякоти они распределены менее равномерно. Содержание хлоропластов в тканях плодов яблони, как правило, ниже, чем в листьях, что, в свою очередь, снижает скорость фотосинтеза на единицу площади. Однако бывают исключения (Rudikovskaya et al., 2025, в печати).

На ранних стадиях развития плодов яблони растворимые сахара необходимы для обеспечения их энергией, для того чтобы они могли полноценно поддерживать клеточное деление и последующий рост клеток. По этой причине плоды на данной стадии становятся мощным поглощающим органом (органом-акцептором) (Zhang et al., 2004). Регулируемые силой поглощения, фотоассимиляты перемещаются из материнского дерева в ткани плодоножек. Однако в период роста растущие побеги также являются сильными органами-акцепторами, что вызывает конкуренцию за эти ресурсы (Costa et al., 2005). Это приводит к естественному опадению более слабых плодов. Такое явление называется «июньским опадением» или физиологическим опадением плодов (Kolarič, 2010; Tijero et al., 2021).

Стадия пролиферации в плодах яблонь обычно завершается через 3–4 недели после опыления (Harada et al., 2005). За этот промежуток времени в мезофилле листьев образуются и накапливаются сорбитол и сахароза. Они поступают в незрелые плоды, превращаясь во фруктозу и глюкозу, которые идут на нужды развивающегося плода (Yamaki, 2010). Фруктоза является

основной формой РС, накапливающихся в вакуолях (Tijero et al., 2021). По мере развития, плоды продолжают накапливать всё больше растворимых сахаров в вакуолях, тем самым создавая осмотическое давление, которое стимулирует приток воды, что в свою очередь регулирует увеличение и растяжение клеток (Yamaki, 2010; Sha et al., 2020).

Следует отметить, что регуляция метаболизма растворимых сахаров в плодах — это сложный и многогранный процесс, включающий взаимодействие различных факторов, таких как факторы транскрипции, гормоны, эпигенетические модификации, экологические сигналы. Благодаря обширным исследованиям был достигнут значительный прогресс в понимании механизмов, лежащих в основе регуляции метаболизма сахара в плодах.

Однако некоторые аспекты всё еще требуют дальнейшего изучения. Необходимы дополнительные исследования для выяснения роли гормонов и их влияния на регуляцию метаболизма растворимых сахаров. Важно также более подробно изучить влияние факторов окружающей среды, выявить и охарактеризовать конкретные сигнальные пути, участвующие в регуляции метаболизма РС в плодах. Более того, необходимо глубже понять метаболические взаимодействия между метаболизмом сахаров и другими метаболическими путями. Наконец, решающее значение приобретает всестороннее понимание того, как регуляция метаболизма РС изменяется на разных стадиях развития плода.

2.2. Пектины

Известно, что продукты разрушения полисахаридов клеточной стенки, образующиеся при её размягчении на стадии биологической зрелости, могут служить субстратами для галактуронового пути синтеза АК (Zhang, 2012). Пектин — это один из основных компонентов клеточной стенки растений и, вероятно, одна из самых сложных макромолекул в природе (Ridley et al., 2001; Voragen et al., 2009).

Пектин является компонентом клеток всех высших растений, а также клеток голосеменных, мохообразных и харофитовых водорослей (O'Neill et al., 2004; Matsunaga et al., 2004; Popper, 2008). В растительных клетках пектины содержатся в срединной пластинке, в первичной и вторичной клеточных стенках (Caffall, Mohnen, 2009). Доля пектинов в составе первичной клеточной стенки достигает до 35% всего полисахаридного состава у двудольных растений и от 2% до 10% — у однодольных (O'Neill et al., 1990). Пектины участвуют в процессе роста и растяжения клеток, обеспечивают межклеточную адгезию, пористость клеточных стенок; некоторые пектиновые вещества выполняют сигнальную функцию и участвуют в процессе защиты клеток от патогенов (Voragen et al., 2009; Jarvis, 2009; Daher, Braybrook, 2015; Wu et al., 2018; Delmeret al., 2024, Ставицкая и др., 2025, в печати).

В зависимости от степени полимеризации и других параметров, пектиновые вещества в клетке могут быть представлены в виде различных соединений, таких как нерастворимый протопектин, водорастворимый пектин и др. (Оводова и др., 2010). Структура и химический состав пектиновых веществ различается не только у разных видов растений, но и у разных органов одного и того же растения (Mohnen, 2008). Известно, что соотношение фракций водорастворимого пектина и протопектина в плодах некоторых культурных растений напрямую связано со стадией их созревания: по мере приближения к стадии биологической зрелости количество протопектина в них уменьшается (Ornelas-Paz et al., 2018; Wang et al., 2018).

Биосинтез и деградация пектинов. Пектины синтезируются в клетках в аппарате Гольджи и транспортируются к стенке в мембранных везикулах (Willats et al., 2001; Mohnen, 2008). Предположительно, некоторые начальные этапы синтеза могут происходить в ЭПР, а некоторые этапы сборки происходят непосредственно в клеточной стенке. Ввиду сложности структуры пектиновой цепи для её синтеза требуется большое количество различных ферментов. Согласно современным данным, в среднем для синтеза и модификации пектиновой цепи требуется более 60 типов ферментов, включая

гликозилтрансферазы, метилтрансферазы, ацетилтрансферазы и многие другие (Narholt et al., 2010). Также большое количество ферментов необходимо для деградации пектиновых цепей. Однако к настоящему времени идентифицирована только часть этих ферментов. Набор таких ферментов, как и ферментов деполимеризации и деградации пектинов, очевидно, видо- и сортоспецифичен (Mohnen, 2008).

Различные пектиновые полисахариды могут образовывать связанные ионами кальция и бора домены, состоящие из более простых структур.

Синтез пектина проходит в несколько стадий. Первая из них — стадия синтеза и удлинения основной цепи (Atmodjo et al., 2013), вторая — стадия сшивания основных цепей с боковыми цепями и их модификация (Ebert et al., 2018), третья — стадия связывания цепей в домены (Lerouxel et al., 2006; Atmodjo et al. 2013). «Готовые» пектиновые полимеры затем направляются к клеточной стенке при помощи движения пузырьков Гольджи. В дальнейшем, в зависимости от условий и нужд растения пектиновые вещества могут подвергаться дополнительным модификациям (Chen et al., 2015).

Структура пектинов. Существует несколько типов структур пектиновых полисахаридов. (рис. 5).



Рисунок 5. Схема строения пектиновых полисахаридов (Harolt et al., 2010), с изменениями.

Их можно разделить на: гомогалактуронан (ГГН); рамногалактуронан I типа (РГ I) и рамногалактуронан II (РГ II); модифицированные гомогалактуронаны, например, такие как ксилогалактуронан (КГН), апиогалактуронан (АГН) (Zdunek et al., 2021)

Соотношение их содержания в клетке варьирует, но, как правило, ГГН является наиболее распространенной формой, составляющей около 65% всех пектиновых структур в клетке, в то время как РГ I составляет от 20% до 35% (Mohnen, 2008). КГН и РГ II являются второстепенными компонентами, доля которых составляет менее 10% (Zandleven et al., 2007; Mohnen, 2008).

Гомогалактуронан. Гомогалактуронан является структурно простой и наиболее распространенной формой пектина в большинстве типов клеточных стенок растений (Voragen et al., 2009). Он состоит из линейной цепочки связанных остатков галактуроновой кислоты, каждый из которых может быть этерифицирован или ацетилирован (Senechal et al., 2014). Степень полимеризации гомогалактуронана варьируется в широких пределах (Yaro et al., 2011; Guo et al., 2022). Молекулы гомогалактуронана, содержащие участки деэтерифицированных остатков галактуроновой кислоты и имеющие длину не менее 10 остатков, могут формировать межмолекулярные сшивки при помощи ионов Ca^{2+} , образуя структуру «яичной коробки» («egg-box») (Gawkowska et al., 2018; Cao et al., 2020). Гомогалактуронан может быть модифицирован боковыми цепями, содержащими ксилозу (образуя ксилогалактуронан), апиозу (образуя апиогалактуронан) и др. Этерифицированный гомогалактуронан также может образовывать спиральные структуры в клеточной стенке (Goldberg et al., 1996).

Рамногалактуронан I. В отличие от гомогалактуронана и рамногалактуронана II основа рамногалактуронана I состоит из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы (Оводов, 2009; Patova et al., 2014). Линейные и/или разветвленные боковые цепи, состоящие из арабинанов, галактанов и арабиногалактанов различной длины, располагаются на жестком гомогалактуронановом каркасе (Yaro, 2011). У некоторых растений боковые

цепи галактана содержат на концах фукозу (Caffall, Mohnen, 2009), а боковые цепи арабинана и галактана могут содержать концевые фрагменты феруловой кислоты (Ishii, 1997). Эти структуры потенциально могут образовывать сшивки и превращаться в димерные структуры РГ I \times РГ I (Ralet et al., 2005).

РГ I можно описать как структуру, в которой чередуются «волосистые» участки с большим количеством различных боковых цепей и «гладкие» участки, преимущественно состоящие из гомогалактуронана (Yaro, 2011).

Рамногалактуронан II. Рамногалактуронан II (РГ II) является наиболее структурно сложным типом пектинов. Его структура достаточно консервативна у всех видов растений. Она состоит из гомогалактурогана с присоединенными к нему боковыми цепями, состоящими из 12 различных типов сахаров и соединенными более чем 20 типами различных связей (O'Neill et al., 2004). РГ II обычно присутствует в стенках растений в виде димера РГ II \times РГ II, сшитого по апиозным остаткам боковых цепей при помощи ионов бора (O'Neill et al., 1996). Образование димеров приводит к перекрестному соединению двух цепей ГГ, что ведёт к формированию трехмерной пектиновой сети (O'Neill et al., 1996).

Мутации, вызывающие даже незначительные изменения в структуре РГ II, приводят к снижению образования димеров РГ II и серьезным дефектам роста, например, таким как карликовость (Perez et al., 2003). Это позволяет предположить, что димеризация РГ II в клеточной стенке имеет важное значение для нормального роста и развития растений.

Распространение пектинов в клетках и тканях растений. Наибольшее содержание пектинов наблюдается в быстрорастущих тканях, таких как гипокотиль проростков, меристематические ткани (Palin, Geitmann, 2012; Saffer, 2018). Пектины в большом количестве содержатся в семенных оболочках некоторых видов растений, где они являются компонентом слизей, способствующих гидратации проростков во время набухания (North et al., 2014). Также они обнаруживаются в сочных плодах многих видов двудольных, где они защищают заключенные в оболочку семена и поддерживают плод в

гидратированном состоянии (Cerri, Reale, 2020). Из-за их высокой распространенности в быстрорастущих тканях и низкой — во вторичных клеточных стенках можно сделать предположение, что содержание пектинов в тканях динамично изменяется как в процессе роста тканей, так и в процессе их дифференциации.

Пектин в плодах имеет непосредственное отношение к их созреванию и мацерации (Prasanna et al., 2007; Wang et al., 2018). Структурные изменения во время созревания плодов происходят главным образом из-за растворения средней пластинки, снижения адгезии между клетками и ослабления клеточных стенок паренхимы (Paniagua et al., 2014; Pose et al., 2019) в результате действия ферментов, модифицирующих клеточные стенки. В процессе созревания плодов пектины претерпевают значительные изменения. Они включают в себя процессы солюбилизации, деполимеризации и потерю боковых цепей (Ornelas-Paz et al., 2018). Недавние исследования плодов клубники (Figuerola et al., 2010) и яблони (Atkinson et al., 2012), свидетельствуют о том, что расщепление пектина является ключевым фактором изменения текстуры плодов.

3. Род *Malus*: введение в культуру, селекционный потенциал

3.1. История возникновения и современная классификация рода *Malus* Mill.

Malus Mill. относится к порядку Rosales, семейству Rosaceae (Sun et al., 2018). Произрастает в основном в умеренном климате северного полушария (Седов, 2020). Ареал рода *Malus* включает в себя территории Европы, Азии и Северной Америки. Ареал представляет собой широкую неравномерную полосу к северу и югу от 45-й параллели (Лангенфельд, 1991., Cornille et al., 2012) (рис. 6).

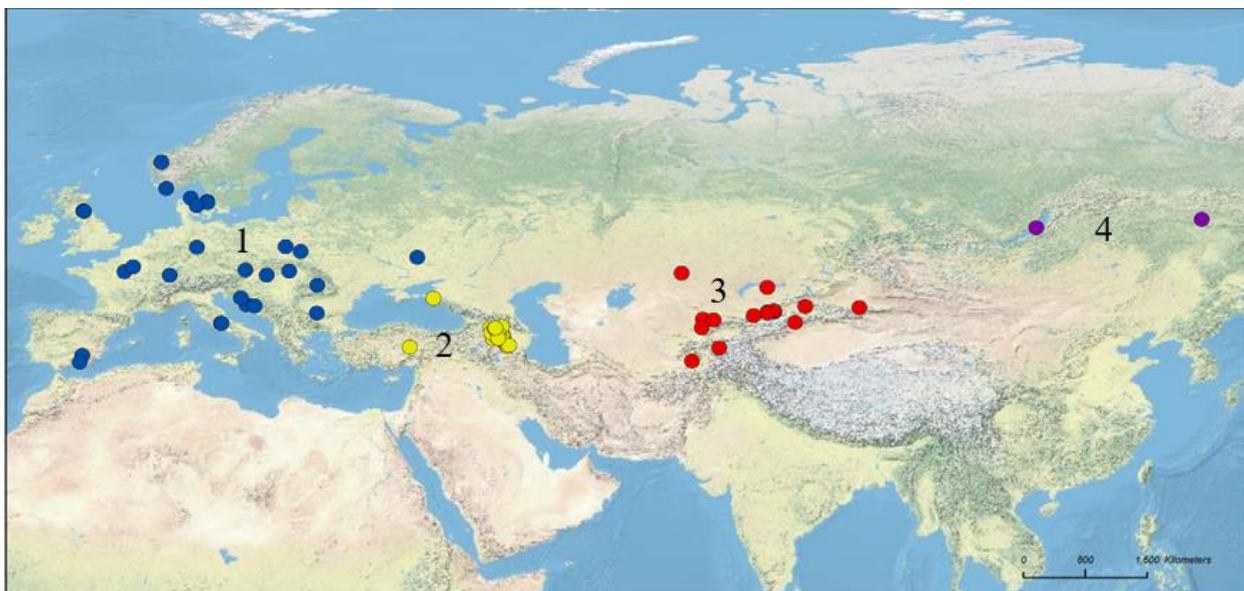


Рисунок 6. Ареал распространения *M. sylvestris* (синий, 1), *M. orientalis* (жёлтый, 2), *M. baccata* (фиолетовый, 4), *M. sieversii* (красный, 3), (Cornille et al., 2012).

Яблоня как культура стала известна древнему человеку около 10-15 тыс. лет назад. Это подтверждается остатками плодов и их схематическими изображениями, обнаруженными на месте раскопок древних поселений (Козловская, 2015; Опалко и др., 2019). На данный момент определены три центра генетического разнообразия рода *Malus* Mill. — азиатский, европейский, среднеазиатский (Juniper et al., 1996; Пономаренко, Пономаренко, 2013). В этих центрах сконцентрирован весь видовой потенциал дикорастущей яблони. На территории каждого центра существуют районы более позднего расселения яблони, участки, более благоприятные для ее произрастания, где вид представлен самыми многочисленными популяциями, и менее благоприятные, где яблони встречаются относительно редко (Пономаренко, 2013).

Род *Malus* отличается значительным морфологическим разнообразием. Виды этого рода представляют собой сложную систему экотипов, форм и вариаций (Höfer et al., 2014). Виды *Malus* совместимы и легко скрещиваются, создавая большое количество межвидовых гибридов (Савельева, 2016).

Вопрос о количестве видов в настоящее время остается дискуссионным. Различные исследователи выделяют от 8 до 78 основных видов (Robinson et al., 2001; Hancock et al., 2008). Ввиду этого до сих пор нет единой таксономической системы, что осложняет проведение селекционных работ и создание коллекций. На данный момент распространенной и опорной классификацией рода *Malus* является классификация В. Т. Лангенфельда (1991), который систематизировал виды яблони по совокупности географических, экологических и морфологических критериев.

Согласно классификации Лангенфельда, род *Malus* подразделяется на шесть секций:

1. *Eriolobus* (пушистолопастные);
2. *Dociniopsis* (доциниевидные);
3. *Sorbomalus* (рябиновидные);
4. *Chloromeles* (зелёноплодные);
5. *Gymnomeles* (мелкоплодные);
6. *Malus* (настоящие яблони).

В настоящее время яблоня занимает одно из первых мест по мировому объему плодового производства среди других плодовых культур — более 95 млн. тонн за 2023 год (FAOstat, 2023). Широкому распространению и формированию большого сортимента яблони способствовало сочетание видового разнообразия, сильной внутривидовой изменчивости и, как следствие, высокой адаптивности (Седов, 2015).

Malus domestica (также называемая *Malus* × *domestica* (Suckow) Borkh. для указания ее гибридного происхождения) считается результатом одомашнивания с последующей межвидовой гибридизацией (Gross et al., 2012; Pereira-Lorenzo et al., 2018). Это не естественно эволюционировавший вид: он отбирался, гибридизовался и транспортировался людьми на протяжении тысячелетий (Juniper et al., 1996).

Считается, что его первичным диким предком является *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem., (Gross et al., 2012; Cornille et al., 2012; Pereira-Lorenzo et al., 2018), ареал которого располагается в районе западной границы Китая (Wang et al., 2018). Это было подтверждено недавними исследованиями (Velasco et al. 2010).

Другие виды, которые, как считается, внесли свой вклад в формирование *M. domestica*: *M. baccata* (L.) Borkh., *M. baccata* var. *mandshurica* (Maxim.) C.K.Schneid, *M. prunifolia* (Willd.) Borkh., *M. orientalis* Uglitzk., *M. sylvestris* (L.) Mill. (Velasco et al. 2010; Pereira-Lorenzo et al., 2018). Вероятно, эти виды не раз скрещивались с культивируемыми яблонями (Hancock et al., 2008).

При развитии современных селекционных программ свой вклад в формирование комплекса *M. domestica* также внесли: *Malus* × *floribunda* Siebold ex Van Houtte, *Malus* × *kaido* (Wenz.) Pardé, *Malus* × *atrosanguinea* (Späth) C.K. Schneid., *Malus* × *zumi* (Matsum.) Rehder, *Malus toringo* (Siebold) de Vriese (Hancock et al. 2008; Velasco et al. 2010).

Поскольку *M. domestica* — сборный, культигенный, гибридогенный и полифилетический вид, в происхождении которого участвовало несколько базовых видов, её генетический потенциал весьма обширен и позволяет вести селекцию в различных направлениях (Pereira-Lorenzo, 2018).

3.2. Введение представителей рода *Malus* в культуру в Сибири

Введение яблони в культуру в Сибири началось относительно недавно, в XIX веке (Макаренко, 2017). Первые попытки выращивания плодовых культур оканчивались неудачей. В конце XIX столетия обрела популярность теория акклиматизации Грелля (Бондаренко и др., 2016). Он рекомендовал использовать *M. baccata* в качестве подвоя, способного передавать свои зимостойкие свойства. В связи с развитием плодоводства, дальнейшим изучением его принципов занимались такие выдающиеся деятели как Крутовский, Никифоров, Олониченко. С конца XIX века В. М. Крутовский активно занимался искусственной гибридизацией яблони. Используя в

качестве исходной формы *M. baccata* (L.) Borkh., как источника зимостойкости, он получил устойчивое к низким температурам, но мелкоплодное потомство (Матвеева и др., 2025). Достижением Никифорова считается распространение завезенной им из Китая Ранетки пурпуровой, которая стала родительской формой для многих сибирских сортов (Савинич, 2016). С 1930-х годов создаются плодовые опытные поля и экспериментальные участки Урале и в Сибири — в Екатеринбурге, Красноярске, Иркутске и других городах (Макаренко, 2017). В результате работы многих исследователей были созданы первые зимостойкие сибирские сорта яблони с плодами весом 8–35 г, которые стали основой первого сортимента яблони в Сибири.

В наше время в условиях Сибири и Дальнего Востока широко распространено выращивание яблони на подвое, в качестве которого активно используется *M. baccata* (L.) Borkh. Она отличается неприхотливостью, зимостойкостью, выдерживая температуры до -55°C, высокой толерантностью к солнечным ожогам и устойчивостью к парше и некоторым другим заболеваниям яблонь (Васильева, 1991; Макаренко, 2018). Наряду с *M. baccata* в селекции используются её садовая форма (яблоня ягодная).

Первое поколение *M. baccata* (F1), выведенное путем скрещивания *M. baccata* (L.) Borkh. с сортами *M. × domestica* (Sukhow) Borkh., является мелкоплодным (до 15 г), с неудовлетворительным «сибирским вкусом», но при этом сохраняет скороплодность и зимостойкость. В Сибири оно именуется «ранетка». (Макаренко, 2017). Гибриды F2, F3 и т.д. *M. baccata* в Сибири называют «полукультурка» или «китайка» (Макаренко, 2017). Они имеют плоды большего размера и гораздо лучшие вкусовые качества.

3.3. Перспективы развития пребридинговых исследований

В мировом сортименте насчитывается более 10 тыс. сортов яблони (Седов и др., 1995). В России районировано около 500 сортов (Госреестр, <https://gossortrf.ru/registry/>). Интенсификация пловодства и садоводства влечёт за собой необходимость выведения новых сортов с определенными

характеристиками, выращивание которых позволит обеспечить круглогодичное снабжение населения свежими и переработанными плодами.

Стратегия селекции яблони предусматривает наличие в новых сортах ряда показателей. Деревья должны обладать небольшим размером и/или иметь карликовость, отличаться компактным размером кроны, удобной как для ухода, так и для сбора плодов, высокой урожайностью. Также они должны отличаться ранним и регулярным плодоношением, устойчивостью к характерным для региона заболеваниям, адаптированностью к климатическим условиям планируемого региона выращивания. Помимо этого, плоды должны обладать ценными потребительскими качествами, продолжительным сроком хранения, привлекательным внешним видом (Седов, 2015; Pereira-Lorenzo et al., 2018).

Успешное создание сорта, в первую очередь, определяется правильным подбором исходных родительских форм, имеющих множество ценных признаков и передающих их потомству. Это могут быть, в частности, сорта народной селекции (Седов и др., 2020), а также аборигенные дикие виды, адаптированные к региону выращивания.

Высокая гетерозиготность яблони (Broothaerts, Van Nerum, 2002; Ignatov, Bodishevskaya, 2010) приводит к большому разнообразию потомства, и при этом только небольшая его часть представляет собой значительное улучшение родительских форм. Поскольку большинство признаков находятся под полигенным контролем (Brown, Janick, 1992), низкая эффективность генетического улучшения линий разведения вкупе с длительным ювенильным периодом делают разведение новых сортов яблони медленным и ресурсозатратным процессом. В настоящее время, когда классические селекционные методы, такие как гибридизация, инбридинг, выведение полиплоидных яблонь, использование мутагенеза достаточно освоены, дальнейшее развитие процессов селекции идет по направлению привлечения новейших, в том числе молекулярно-генетических инструментов и их сочетаний.

Чрезвычайно важным событием в рамках молекулярно-генетических исследований рода *Malus* стала расшифровка генома *M. × domestica* (Velasco et al., 2010) и *M. baccata* (Chen et al., 2019). Благодаря этому были идентифицированы гены, связанные с устойчивостью, вкусом плодов (например, гены *MADS-box*, участвующие в цветении и метаболизме сорбитола (Zhang et al., 2024)) и другими агрономическими характеристиками. В связи с этими достижениями особое развитие получила маркерная селекция.

В настоящее время молекулярно-генетические и биохимические маркеры широко применяются для решения различных задач, связанных с определением видовой принадлежности, установлением степени родства, а также выявлением хозяйственно-полезных признаков. Они позволяют установить генетическую основу фенотипической изменчивости и разработать стратегии для идентификации локусов хромосом, определяющих проявление количественных генов, известных как QTL (англ. quantitative trait loci) (Ignatov, Bodishevskaya, 2010). Используя молекулярные маркеры, можно существенно сократить процесс предварительного отбора (Хлесткина, 2015), так как нужные признаки могут быть идентифицированы задолго до того, как они проявятся на взрослом растении. Молекулярные маркеры имеют значительные преимущества перед другими методами исследования. Они обеспечивают большую надежность, информативность и воспроизводимость результатов (Al-Samarai, Al-Kazaz, 2015; Amom, Nongdam, 2017). Геномная селекция является дальнейшим направлением развития маркерной селекции. Создание маркерных профилей делает возможным проведение ещё более надежного и точного отбора при выборе подходящих родительских пар (Kumar et al., 2014; Столповский и др., 2020).

Применение вышеперечисленных приемов и их комбинаций позволяет выводить новые сорта и внедрять их в производство в значительно более короткий срок, в отдельных случаях всего за 12–14 лет (Седов и др., 1995). Кроме того, эти методы значительно сокращают время исследования отдельных конкретных признаков и генов, ответственных за тот или иной

признак. Так, например, геном *M. domestica*, увеличивающим содержание АК в плодах, считается ген *DHAR*, отвечающий за синтез одноименного фермента, участвующего в системе рециклинга АК (Li et al., 2011). Однако, следует отметить, что система рециркуляции АК также включает в себя фермент МДГАР. Его вклад в поддержание оптимального уровня АК в тканях растения может быть более существенным по сравнению с вкладом ДГАР для определенных видов или сортов.

Необходимо отметить, что для создания нового сорта яблони огромное значение имеет стадия **предварительной селекции**. Эта стадия является самым первым этапом создания сорта. Знание генеалогии сортов яблони, изучение биохимического профиля и метаболических путей родительских видов позволяет максимально полно оценить вероятность проявления у потомков ценных признаков и является бесценным инструментом при выведении нового сорта.

К настоящему времени селекционный ресурс *M. domestica* в основном исчерпан (Kumar et al., 2014). Международным трендом при выведении новых сортов является привлечение сортов народной селекции и аборигенных видов, которые зачастую обладают целым спектром полезных свойств. Популяции диких видов яблонь являются ценным ресурсом для идентификации и сохранения аллельных вариантов, отвечающих за критически важные фенотипические признаки, такие как устойчивость к патогенам, морозостойкость и вкусовые характеристики плодов (Ignatov, Bodishevskaya, 2010). Следует отметить, что сведения о метаболоме аборигенных видов в настоящее время фрагментарны и ограничиваются общими данными (Rudikovskaya et al., 2019).

Использование аборигенных видов для улучшения качества плодов и агротехнических свойств деревьев обладает не только прикладной ценностью, но и представляет собой значимое направление фундаментальных исследований. Это направление требует детального изучения не только метаболических процессов, но и сложных взаимосвязей между ними, что, в

свою очередь, позволит глубже понять механизмы адаптации и продуктивности растений в различных экосистемах. Это также облегчит выявление и долгосрочное сохранение уникального генофонда диких видов яблонь, который является неотъемлемой частью глобального биоразнообразия.

Стратегия селекции яблони предусматривает развитие в новых сортах целого комплекса показателей. Е. Н. Седов (2015) отмечает, что для каждого региона страны существуют свои показатели, которых следует добиваться в процессе выведения нового сорта. Так, например, в условиях зон с континентальным климатом необходимо делать упор на такие качества, как зимостойкость, скороплодность, повышенное содержание аскорбиновой кислоты в плодах и др. (Кичина, 2011).

Для *M. domestica* перспективным донором полезных признаков является *Malus baccata* (L.) Borkh. Помимо зимостойкости и устойчивости к некоторым грибковым заболеваниям, она отличается крайне высоким содержанием АК в плодах (Fang et al., 2017; Stavitskaya et al., 2023). Однако данные о биохимическом составе, генетических и метаболических особенностях плодов диких видов, включая *M. baccata*, фрагментарны и разрознены. Помимо этого, существует большое количество гибридных сортов *M. baccata* (F1, F2, F3 и т.д.). Несмотря на то, что такие растения широко распространены в Сибири, биохимический состав их плодов и особенности метаболизма АК также остаются малоизученными.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы было изучение особенностей синтеза, накопления и рециркуляции аскорбиновой кислоты в тканях плодов *M. baccata* (L.) Borkh. и её гибридов F1 на разных стадиях развития.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования были использованы плоды яблони сибирской (*M. baccata* (L.) Borkh.), яблони домашней (*M. domestica* (Suckow) Borkh.) сортов Чудное и Раннее Болоняева и их гибриды F1 сортов Добрыня, Ранетка пурпуровая, Пальметта (Таблица 1). Морфометрические параметры плодов отражены в Таблице 2. Все использованные генотипы были выращены на экспериментальном участке Биоресурсного центра Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии Наук (52°16' с. ш., 104°17' в. д.). *M. baccata* была привезена из природной популяции из долины реки Селенги. Прививочный материал сорта Добрыня и Ранетка пурпуровая был взят из Ботанического сада ИГУ (Иркутск), сорта Пальметта — из Центрального Сибирского Ботанического сада СО РАН (Новосибирск), сорта Чудное — из Шушенского государственного плодово-ягодного сортоиспытательного участка, сорт Раннее Болоняева — из Дальневосточного научно-исследовательского института сельского хозяйства. В качестве подвоя использовалась *M. baccata*. Плоды отбирались на разных стадиях развития плодов: на 20-й день после образования завязи (1-й этап), на 50-й день после образования завязи (2-й этап) и на стадии биологической зрелости (3-й этап), определяемой для каждого гибрида и вида по совокупности признаков. Сбор плодов осуществлялся в 2020, 2021 и 2022 годах. Кожицу и мякоть срезали тонким слоем ножом из нержавеющей стали. Ткани плодов взвешивали, фиксировали жидким азотом и хранили до анализа при температуре – 27 °С.

Таблица 1. Сведения о происхождении объектов исследований.

Название	Гибридность (поколения)	Родительские сорта	Авторы сорта
<i>Malus baccata</i>	—	—	—
Добрыня	F1	<i>M. baccata</i> × Коробовка	С. Н. Любочко, Н. Н. Тихонов, А. С. Толмачева (https://vniispk.ru/).
Пальметта	F1	Бельфлер-китайка × <i>M. baccata</i>	В.Н. Васильева, Н.В. Моисеева (https://vniispk.ru/).
Ранетка пурпуровая	F1	Происхождение сорта неизвестно	—
Чудное	<i>Malus domestica</i>	Гибрид (Уральское зимнее × 11-20-12) × Выдубецкая плакучая	М.А. Мазунин (https://vniispk.ru/).
Раннее Болоняева	<i>Malus domestica</i>	Абориген × Амурское красное	А. В. Болоняев, К. Л. Стефанский (https://vniispk.ru/).

Таблица 2. Морфометрические параметры плодов 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

	Параметры целого плода	Ювенильная стадия	Стадия активного роста	Стадия зрелости
<i>M. baccata</i>	Вес, г	0,2±0,1	0,4±0,0	0,8±0,1
	Объём, см ³	0,3±0,0	0,3±0,0	0,9±0,1
	% сухого веса	17,4±2,4	28,6±4,6	30,0±0,7
	Размер клеток, мкм	—	—	17,1±3,3
Добрыня	Вес, г	0,8±0,2	3,3±0,9	8,0±1,0
	Объём, см ³	10,0±0,0	3,3±0,9	9,5±1,6
	% сухого веса	13,0±4,4	18,1±1,9	17,1±1,4
	Размер клеток, мкм	—	—	31,2±6,3
Ранетка пурпуровая	Вес, г	1,3±0,3	3,2±0,8	7,4±0,6
	Объём, см ³	1,3±0,3	3,1±0,8	10,0±2,0
	% сухого веса	15,8±0,2	19,2±1,7	16,7±1,4

	Размер клеток, мкм	—	—	49,4±10,7
Пальметта	Вес, г	1,9±0,1	13,1±1,8	27,3±0,2
	Объём, см ³	3,2±0,7	17,7±1,5	35,2±2,4
	% сухого веса	14,4±1,7	14,9±0,7	16,1±0,9
	Размер клеток, мкм	—	—	23,1±3,5
Чудное	Вес, г	2,2±1,4	16,8±3,9	62,9±17,0
	Объём, см ³	4,5±0,5	33,3±9,3	65,2±12,8
	% сухого веса	10,00±0,00	13,1±0,5	11,4±0,9
	Размер клеток, мкм	—	—	22,8±3,1
Раннее Болоняева	Вес, г	4,1±2,6	32,8±0,9	102,5±20,2
	Объём, см ³	3,2±1,8	33,2±7,7	119,7±31,4
	% сухого веса	11,7±0,0	10,7±0,4	9,9±1,0
	Размер клеток, мкм	—	—	23,9±3,8

Размер клеток определяли при помощи светового микроскопа Carl Zeiss Jena (Германия). Для определения объёма плодов в мерный цилиндр наливали дистиллированную воду до отметки в 100 мл. Затем в мерный цилиндр помещали плод и измеряли получившийся объём. По разности объёмов в мерном цилиндре рассчитывали объём плода.

Сырой вес тканей плодов определяли взвешиванием на аналитических весах Shimadzu ax 120. Для измерения сухого веса предварительно взвешенные ткани плодов помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 80 °С в течение 24 ч, затем охлаждали и измеряли вес высушенных тканей. Процент сухого веса определяли по формуле:

$$\% \text{ сухого веса} = (A/B) * 100\%, \text{ где } A - \text{сырой вес, } B - \text{вес после сушки.}$$

Ниже приведены имеющиеся в литературе характеристики использованных объектов исследования.

***Malus baccata*:** дерево до 8 метров высотой, крона шаровидная, округлая, листья неопушенные, эллиптические. Цветки средней величины, лепестки белые. Плоды очень мелкие, до 10 мм в диаметре, средний вес плода от 0,3 до 0,5 г, красного или желто-зеленого цвета с красным бочком (рис. 7). Мякоть твердая, желтая, терпкого, кислого вкуса. При созревании мякоть плодов может мацерироваться. Вид отличается высокой зимостойкостью и устойчив к парше (<https://vniispk.ru/>).



Рисунок 7. Плоды *M. baccata* на этапе зрелости.

Сорт «Добрыня»: дерево сильнорослое, с округлой кроной. Плоды мелкие, плоскоокруглые, ребристые. Цветки средней величины, белые или

бледно-розовые. Плоды мелкие, средний вес от 12 до 14, яркого, красно-пурпурового цвета. (рис. 8). Мякоть плодов зеленоватая, плотная, сладко-кислого вкуса с заметной терпкостью, которая при замораживании исчезает. Сорт зимостойкий, среднеустойчив к парше (<https://vniispk.ru/>).



Рисунок 8. Плоды генотипа Добрыня на этапе зрелости.

Сорт «Ранетка пурпуровая»: дерево сильнорослое, с широкоовальной кроной. Плоды мелкие, плоские или плоскоокруглые формы, темно-красные (рис. 9). Мякоть желтая, плотная, кислая, с терпким привкусом. Сорт отличается высокой зимостойкостью и низкой устойчивостью к парше (<https://vniispk.ru/>). Предположительно является крупноплодной формой *M. baccata* (*M. baccata* var. *macrocarpa*). Однако, более вероятно, представляет собой гибрид *M. baccata* с крупноплодным сортом (Исачкин, Воробьёв, 2003).



Рисунок 9. Плоды генотипа Ранетка пурпуровая на этапе зрелости.

Сорт «Пальметта»: дерево среднерослое, крона компактная. Плоды репчато-округлой формы, средний вес от 25 до 30 г. Основная окраска плодов светло-желтая, румянец малиновый по большей части плода (рис. 10). Мякоть кремоватая, средней плотности, мелкозернистая, терпкая, слабоароматная. Сорт зимостойкий, устойчив к парше (<https://vniispk.ru/>).



Рисунок 10. Плоды генотипа Пальметта на этапе зрелости.

Сорт «Чудное»: естественный карлик, крона плоско-горизонтальная. Высота деревьев на семенных подвоях до 2-х м. Средняя масса плодов 55. Плоды правильной конической формы, гладкие, слаборебристые (рис. 11). Основная окраска зеленовато-желтая, покровная — румянец в виде загара. Мякоть плода зеленоватая, средней плотности, мелкозернистая, хорошего вкуса. Сорт отличается зимостойкостью, устойчив к парше (<https://vniispk.ru/>).



Рисунок 11. Плоды генотипа Чудное на этапе зрелости.

Сорт **«Раннее Болоньева»**: дерево быстрорастущее, крона узкопирамидальная. Плоды крупные, средний вес от 100 до 120 г, округлой правильной формы (рис. 12). Окраска плодов беловатая или слегка зеленовато-желтая. Мякоть белая, средней плотности, кисловато–сладкого вкуса. Сорт относительно зимостойкий, устойчив к парше (<https://vniispk.ru/>, Исачкин, Воробьёв, 2003).



Рис. 12. Плоды генотипа Раннее Болоньева на этапе зрелости.

Метеорологические условия во время проведения эксперимента отражены в Таблице 3.

Таблица 3. Метеорологические условия 2020–2022 год.

	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
2020 г				
Среднесуточная температура, °С	19,6	22,1	18,7	13,7
Минимальная температура, °С	11,3	14,3	12,9	6,8
Максимальная температура, °С	27,3	28,7	24,6	20,7
Влажность, %	72,0	77,0	88,0	86,0
Осадки, мм	24,0	159,0	112,0	110,0
2021 г				
	Июнь	Июль	Август	Сентябрь

Среднесуточная температура, °С	17,4	21,0	18,4	11,6
Минимальная температура, °С	5,9	13,8	12,2	6,1
Максимальная температура, °С	25,4	26,7	24,3	17,6
Влажность, %	74,0	82,0	87,0	85,0
Осадки, мм	100,0	131,0	100,0	13,0
2022 г				
	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
Среднесуточная температура, °С	19,5	19,6	17,2	14,4
Минимальная температура, °С	7,9	13,3	8,5	7,7
Максимальная температура, °С	26,6	27,2	25,6	20,7
Влажность, %	71,0	77,0	77,0	70,0
Осадки, мм	82,0	110,0	38,0	6,3

Значения среднесуточных температур, а также температурные минимумы и максимумы на протяжении периода вегетации соответствовали общей климатолого-фенологической характеристике месяцев года, характерной для места выращивания плодов. Количество осадков в разные годы эксперимента варьировало, однако это не оказало влияния на изучаемые параметры.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение аскорбиновой кислоты

Навеску растительных тканей 0,3–0,5 г фиксировали в жидком азоте, растирали в предварительно охлажденной ступке до получения гомогенной

массы, затем добавляли 10 мл 0,1%-ной метафосфорной кислоты (Sigma-Aldrich, USA). Количественно переносили получившийся раствор в центрифужные пробирки и обрабатывали ультразвуком при температуре 4 °С 10 минут в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия). Далее центрифугировали (Allegra 64R centrifuge, BeckmanCoulter Life Sciences, USA) 10 минут при температуре 4 °С, 8000 об/мин.

2.2.2. Анализ содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ

Содержание аскорбиновой кислоты исследовали методом ВЭЖХ на приборе Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск). Колонка С18, 2 мм × 75 мм, диаметр зерна 5 мкм, температура колонки 35 °С. В качестве элюента использовали 25%-ный раствор метанола в 0,1%-ной метафосфорной кислоте (Sigma-Aldrich, USA). Для построения калибровочной кривой использовали стандартный образец L-аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, USA). Идентификацию проводили сравнением времени удерживания со стандартным образцом, по УФ-спектру и методом добавок стандартного образца известной концентрации к исследуемому.

2.2.3. Выделение растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) для анализа методом ВЭЖХ

Навеску растительных тканей массой 0,2-0,3 г фиксировали в жидком азоте и растирали до получения гомогенной массы в 10 мл 80%-ного этанола. Раствор количественно переносили в центрифужные пробирки, озвучивали в течение 10 минут при температуре 15 °С в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия) и центрифугировали (центрифуга Allegra 64R, Beckman Coulter Life Sciences, США) в течение 10 минут при температуре 15 °С, 8000 об/мин. Надосадочную жидкость переливали в колбы с круглым дном и выпаривали досуха на ротаторном испарителе при температуре 55 °С. Затем объем пробы доводили до 1 мл деионизированной водой и образцы очищали методом

твердофазной экстракции на концентрирующих картриджах Диапак-Амин. Картриджи предварительно промывали последовательно 5 мл ацетонитрила и 5 мл деионизированной воды. После измерения объема очищенного раствора аликвоту в 200 мкл переносили в эппендорф и смешивали с 600 мкл ацетонитрила (Криохром, Россия).

2.2.4. Анализ растворимых сахаров методом ВЭЖХ

Содержание углеводов (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) исследовали методом ВЭЖХ на приборе Милихром А-02 (Россия), колонка ProntoSIL-120-5-NH₂, диаметр зерна 5 мкм, размеры колонки 2 мм × 75 мм (Эконова, Россия). Элюент — 75%-ный ацетонитрил (Криохром, Россия, сорт 0) в деионизированной воде. Режим элюирования — изократический, скорость потока — 100 мкл/мин, температура колонки 35 °С. Целевые соединения идентифицировали по времени удерживания стандартных образцов, а также методом добавок. Калибровочные кривые строили по известным концентрациям сахарозы, фруктозы, сорбита, галактозы, глюкозы (Sigma-Aldrich, США). В качестве подтверждающего метода был использован анализ углеводов с помощью ГХ-МС.

2.2.5. Выделение растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) для анализа методом ГХ-МС

Для экстракции навеску растительных тканей (0,2–0,3 г) фиксировали в жидком азоте и растирали до однородности. К гомогенату приливали 10 мл 80%-ного этанола. Количественно переносили раствор в центрифужные пробирки, озвучивали 10 минут при температуре 15 °С в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия), затем центрифугировали (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter Life Sciences, USA) 10 минут при температуре 15 °С, 8000 об/мин. К аликвоте супернатанта (100 мкл) добавляли 100 мкл внутреннего стандарта (эритол, НеваРеактив, Россия) и высушивали досуха в токе инертного газа

(азот). Затем добавляли последовательно 200 мкл этилацетата, 200 мкл N, O-бис(триметилсилил)трифторацетотида (BSTFA, N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, Sigma, США) и инкубировали при 70 °C 20 минут.

2.2.6. Анализ растворимых сахаров методом ГХ-МС

Содержание триметилсилильных производных глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы определяли методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS (Agilent Technology, США): капиллярная колонка HP-5MS (30 м × 0,250 мм × 0,50 мкм), неподвижная фаза — 5 %-ный фенил-метилполисилоксан. Объем вводимой пробы — 2 мкл, температура испарителя — 250 °C, источника ионов — 230 °C, детектора — 150 °C, линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, — 280 °C. Диапазон сканирования 41–450 а.е. Градиент температуры от 70 до 280 °C со скоростью 5 °C/мин, а затем от 280 до 300 °C со скоростью 20 °C /мин. Подвижная фаза — гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Разделение потоков 5:1. Масс-спектрометр — квадруполь, способ ионизации — электронный удар (EI) (энергия ионизации 70 эВ). Для идентификации использовали сравнение времени их удерживания со временем удерживания стандартов, а также библиотеку масс-спектров NIST08.

2.2.7. Выделение пектиновых фракций

Выделение пектиновых фракций производили по методу Ермакова (Ермаков и др., 1987) с модификациями автора. Образец растительного сырья (5 г) гомогенизировали с добавлением 25 мл 96 %-ного этанола, нагретого до 85 °C, затем озвучивали в течение 10 минут в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия). Полученный раствор нагревали в течение 20 минут на водяной бане с воздушным холодильником. Далее центрифугировали (центрифуга Allegra 64R, Beckman Coulter Life Sciences, США) в течение 10 минут при 8000 об/мин,

удаляли надосадочную жидкость, к полученному осадку добавляли 25 мл деионизированной воды, нагретой до 45 °С, затем повторно нагревали в течение 1 часа на водяной бане с воздушным холодильником и снова центрифугировали в течение 10 минут при 8000 об/мин. Супернатант количественно переносили в мерные пробирки, измеряя объем полученной водорастворимой фракции пектина.

Для получения фракции протопектина оставшийся осадок смешивали с 20 мл 0,3 Н соляной кислоты, нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане с воздушным холодильником и центрифугировали в течение 10 минут при 8000 об/мин. Супернатант сливали в мерную колбу. Оставшийся осадок промывали горячей водой, отмеряли получившийся объем и смешивали его с раствором 1%-ного лимоннокислого аммония в соотношении 1:1, а затем снова нагревали на водяной бане в течение 30 минут и снова центрифугировали. Супернатант приливали к предыдущему экстракту и измеряли объем.

2.2.8. Количественное определение пектиновых веществ

Содержание пектиновых веществ определяли карбазольным методом (Ермаков и др., 1987; Taylor, Buchanan-Smith, 1992). Перед этим дemetоксилирование проводили следующим способом: 10 мл пектинового экстракта смешивали с 10 мл 0,05 Н раствора NaOH и оставляли при комнатной температуре на 30 минут. После этого к раствору добавляли 10 мл 0,05 Н HCl.

Из каждого образца по 3 мл экстракта переносили в стеклянную пробирку, куда капля за каплей добавляли 3 мл 0,25%-ного раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ в концентрированной H_2SO_4 . Пробирки с образцами тщательно встряхивали и охлаждали на льду. Затем их помещали на кипящую водяную баню на 6 минут, а после охлаждали на льду. К охлажденным образцам добавляли 100 мкл 0,2%-ного раствора карбазола и кипятили на водяной бане 10 минут, затем снова охлаждали на льду. Содержание пектиновых веществ

анализировали спектрофотометрическим методом на приборе Hitachi U-1100 при длине волны 535 нм. Для построения калибровочной кривой использовали известные концентрации галактуроновой кислоты (Sigma-Aldrich, США).

2.2.9. Определение степени этерификация пектиновых цепей

Степень этерификации (СЭ) образцов пектина оценивали методом ИК-спектрофотометрии на приборе FT-IR Spectrum One (Perkin Elmer, США), оснащённом программой Quant+ с возможностью количественного анализа компонентов в сложных смесях. Спектры регистрировались в режиме пропускания в диапазоне волновых чисел 4000–400 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹. Для расчета СЭ использовали формулу (Dranca et al., 2020):

$$\text{СЭ (\%)} = \frac{A_{1730}}{A_{1730} + A_{1600}}, \text{ где } A_{1730} - \text{площадь пика, который соответствует}$$

числу этерифицированных карбоксильных групп, $A_{1730} + A_{1600}$ – сумма площадей пиков, которые соответствуют общему числу карбоксильных групп.

2.2.10. Выделение ферментов ДГАР, МДГАР, АПО

Выделение ферментов проводили по методике (Grace, Logan, 1996) с модификациями. Образцы (3 г кожицы или мякоти) измельчали в предварительно охлажденной ступке с добавлением 3 мл охлаждённого буферного раствора, содержащего 50 мМ КН₂РO₄-КОН (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 0,3% Triton X-100 и 4% поливинилполипирролидона (PVPP). Полученный экстракт выдерживался на льду в течение 10 минут, после чего подвергался центрифугированию при 12000 g в течение 10 минут при температуре 2°C. Работа по выделению проводилась при температуре в помещении не выше 10°C.

2.2.11. Определение активности ферментов ДГАР, МДГАР, АПО

Максимальную активность дегидроаскорбатредуктазы (ЕС 1.8.5.1),

аскорбатпероксидазы (ЕС 1.11.1.11) и монодегидроаскорбатредуктазы (ЕС 1.6.5.4) измеряли спектрофотометрическим методом на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Швейцария) при помощи плоскодонных микропланшет UV-Star (Greiner Bio-One GmbH, Германия). Во всех опытах 10 мкл ферментного экстракта вносили в 200 мкл общего объема инкубационной среды.

Активность ДГАР анализировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,2 мМ дегидроаскорбата (Sigma-Aldrich, США) и 2,5 мМ восстановленного глутатиона (Reanal Private Ltd., Венгрия). Об активности ДГАР судили по увеличению оптической плотности при 265 нм (A_{265}) за 1 мин (коэффициент экстинкции (E) = 14 мМ⁻¹ см⁻¹). Была сделана поправка на неферментативное восстановление дегидроаскорбата.

Активность МДГАР анализировали, добавляя в реакционную среду, содержащую 50 мМ буфера HEPES-KOH (pH 7.6), 2,5 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США), 0,25 мМ НАДФН (Sigma-Aldrich, США), 15 мМ ФАД. (Sigma-Aldrich, США), 0,25 единицы аскорбатоксидазы. Об активности МДГАР судили по уменьшению оптической плотности A_{340} за 2 мин (коэффициент экстинкции (E) = 6,22 мМ⁻¹ см⁻¹).

Активность АПО определяли по снижению A_{290} в реакционной среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.0, 0,5 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich, США) и 0,1 мМ H₂O₂ (E = 2,8 мМ⁻¹ см⁻¹). Была сделана поправка на неферментативное окисление аскорбиновой кислоты пероксидом водорода.

2.2.12. Анализ относительной экспрессии генов *GGP1*, *GGP3*, *DHAR3*, *MDHAR1*

Исследование относительной экспрессии генов было выполнено с помощью метода количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-ПЦР).

Суммарную РНК выделяли из тканей плодов с использованием набора Spectrum Plant Total RNA в соответствии с инструкциями производителя

(Sigma-Aldrich, США). Чистоту и количество выделенной суммарной РНК определяли с помощью нанофотометра NP80 (Implen, Германия). Один микрограмм суммарной РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, Литва) перед обратной транскрипцией. Первую цепочку кДНК синтезировали из 1 мкг суммарной РНК с помощью обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific, Литва) в соответствии с инструкциями производителя с использованием олиго (dT) праймеров.

qRT-ПЦР проводили с использованием сенсорной системы обнаружения ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad, США) с qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия). Все реакции проводили в двух повторностях, содержащих 1 мкл матрицы кДНК (5 нг), 5 мкл 5X qPCRmix-HS SYBR и по 0,5 мкл каждого праймера (10 мкм) в конечном объеме 25 мкл. Условия были следующими: стадия денатурации при 95 °C в течение 5 мин, затем 50 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, отжиг при 60 °C в течение 30 с и элонгация при 68 °C в течение 30 с. Был проведен анализ кривой плавления.

Геноспецифичные последовательности праймеров тестируемых генов перечислены в Таблице 4. Транскрипты eIF-4A были использованы для стандартизации образцов кДНК различных генов (Zubini, 2007, таблица 4). Данные были проанализированы с использованием метода ddCT в программном обеспечении Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories).

Таблица 4. Геноспецифичные последовательности праймеров тестируемых генов.

Ген	Кодируемый фермент	Праймерная последовательность	Gen Bank асс. no.
<i>MdMDHAR1-1</i> (<i>MDHAR1</i>)	Монодегидро - аскорбатредуктаза	F:5'GAGAGAGATTGCTTCCT GACTGGTACAA-3' R:5'GGGAAGATCAGCGTTA ACTATTTTCAGTGT-3'	XM_008393540

<i>MdDHAR3-3</i> (<i>DHAR3</i>)	Дегидро - аскорбатредуктаза	F: 5'- AACCCTCACGGTGGCAATG GTT-3' R: 5'- CCGAGCTTGTTGGGAACAG TGGT-3'	XM_ 0083 7048 5
<i>MdGGP1</i> (<i>GGP1</i>)	ГДФ-L-галактозо - фосфорилаза	F: 5'- TGAAGGTCTCTGAGCTTCT GAACATCCT-3' R: 5'- TATGCAGGCATCAGAGACG GTGTAA-3'	NM_ 0012 9388 5
<i>MdGGP3</i> (<i>GGP3</i>)	ГДФ-L-галактозо - фосфорилаза	F: 5'- CAGTTTAACGAAGGATGGA GTAGGGATT-3' R: 5'- TCCTCCTGCAGTTCCATCCA ACTAA-3'	XM_ 0083 8517 5
MdeIF-4A-8 (Референсный ген)	Фактор инициации трансляции	F: 5'-CTTCATCGTATTGGACG AAGTGGTAGA-3' R: 5'-TGTCATAGAGCATTCCTC TCGTCGTCTT-3'	XM_ 0083 9415 6

2.2.13. Модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками разных путей синтеза АК (фидинг)

Растительные ткани отбирали с плодов, собранных на 20-ый, 50-ый день после образования завязи и на стадии биологической зрелости. Свежий растительный материал (кожица и мякоть) нарезали на одинаковые бруски таким образом, чтобы масса одной навески соответствовала 1,2–1,3 г. Образцы предварительно инкубировали в буферной смеси, содержащей 20 mM MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) (pH 5.5), 300 mM маннитола, 5 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂ и 1 mM CaSO₄ в течение получаса при температуре 25 °C. Затем добавляли выбранные прекурсоры: D-глюкозу, L-галактоно-1,4-лактон, L-галактозу, L-гулоно-1,4-лактон, миоинозитол, D-глюкуроновую кислоту и D-галактуроновую кислоту до концентрации 10 mM и инкубировали на шейкере при температуре 25°C. Через 24 ч образцы

промывали деионизованной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали и фиксировали в жидком азоте(Li et al., 2008).

2.2.14. Статистическая обработка данных

Эксперимент по определению содержания АК, растворимых углеводов тканях и пектинов проводили в 3-х биологических повторностях (n=3). Эксперимент по определению удельной активности ферментов проводили в 3-х биологических и 9-12 аналитических повторностях (n=9–12). Эксперимент по определению уровня экспрессии генов проводили в 4-х биологических повторностях (n=4). Биологической повторностью считали ткани одного плода. Полученные данные представляли в виде средней арифметической, а разброс значений — в виде стандартного отклонения или стандартной ошибки среднего. С помощью критерия Шапиро-Уилка проверяли нормальность распределения. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$. При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними использовали парный двухвыборочный t-тест. Для отличающихся от нормального распределения данных наличие значимых различий рядами данных доказывали с помощью теста Манна-Уитни. Для корреляционного анализа использовали коэффициент Спирмана. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2016, SigmaPlot 12.5.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Содержание АК в тканях на разных стадиях развития плодов

Метаболизм АК в плодах значительно отличается от такового в фотосинтезирующих тканях. Эти различия связаны с тем, что плоды подвергаются физиологическим и биохимическим изменениям во время развития, созревания и хранения после сбора урожая (Lemmens et al., 2020). Способ накопления АК во время развития плодов различается у разных видов растений. Можно выделить три стратегии накопления АК: с накоплением максимального содержания АК в ювенильном периоде, с пиком накопления АК в период роста, с пиком содержания в период достижения плодами зрелости (Ioannidi et al., 2009; Luo et al., 2019, Mellidou et al., 2021). АК в *M. domestica* накапливается в соответствии с первой стратегией — максимальное содержание АК обнаруживаются в плодах на ранней стадии развития, к зрелости, ее содержание падает (Li et al., 2008).

Чтобы получить представление о механизмах, регулирующих накопление АК и выяснить, чем отличаются способы накопления и поддержания уровня АК в плодах *M. baccata* и её гибридов F1 от таковых в *M. domestica*, необходимо отслеживание динамики накопления АК в них на разных стадиях развития плодов: на 20-й день после образования завязи (1-й этап), на 50-й день после образования завязи (2-й этап) и на стадии биологической зрелости (3-й этап), определяемых для каждого гибрида и вида по совокупности признаков.

Анализ динамики накопления АК на 1-м этапе развития показал, что в тканях *M. baccata* регистрировалось максимальное содержание АК среди тканей всех исследованных генотипов во все три года эксперимента (рис. 13). В тканях плодов генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая содержание АК было ниже, чем в тканях плодов *M. baccata*. В тканях плодов генотипов Пальметта, Чудное и Раннее Болоньева содержание АК было минимальным (до 0,1 мг/г сырого веса). Необходимо отметить, что даже такое содержание

АК кратно превышало общепринятое среднее референтное значение этого показателя в плодах *M. domestica* (0,04 мг/г сырого веса).

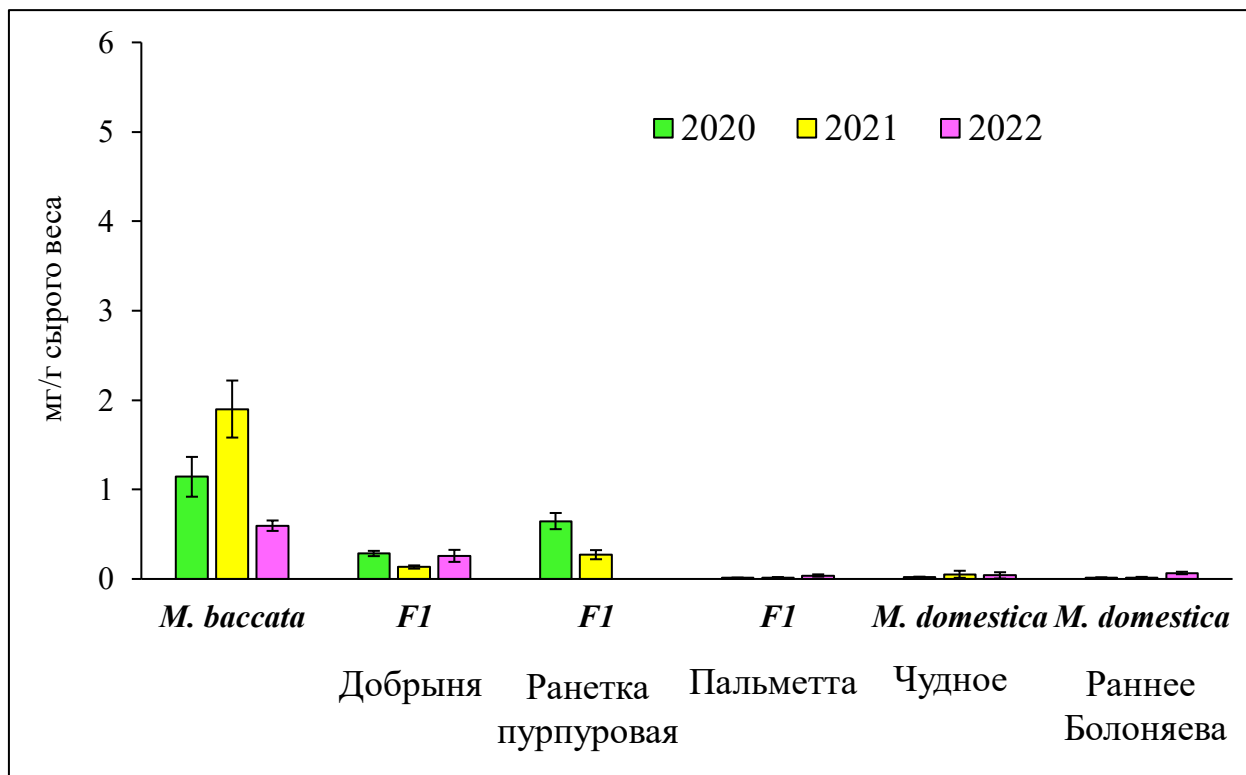


Рисунок 13. Содержание АК в тканях целых плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 1-м этапе развития в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

На 2-м этапе тенденция увеличения АК как в коже (рис. 14), так и в мякоти (рис. 15) плодов *M. baccata*, генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая сохранялась. В коже *M. baccata* максимальное содержание АК было отмечено в 2021 и 2022 гг., оно составляло более 4,3 мг/г сырого веса. В мякоти максимальное содержание АК наблюдали в 2020 и 2021 гг. Содержание АК в мякоти было ниже содержания АК в коже в два раза.

В тканях генотипа Добрыня на протяжении всех лет эксперимента на 2-м этапе развития плодов содержание АК варьировало в диапазоне от 1,23 до 1,74 мг/г сырого веса в коже и от 0,44 до 0,81 мг/г сырого веса в мякоти. В

тканях генотипа Ранетка пурпуровая содержание АК было схожим с таковым в плодах генотипа Добрыня.

В тканях генотипов Пальметта, Чудное и Раннее Болоньева не наблюдали значимого увеличения АК, её содержание в тканях на 2-м этапе развития плодов оставалось низким.

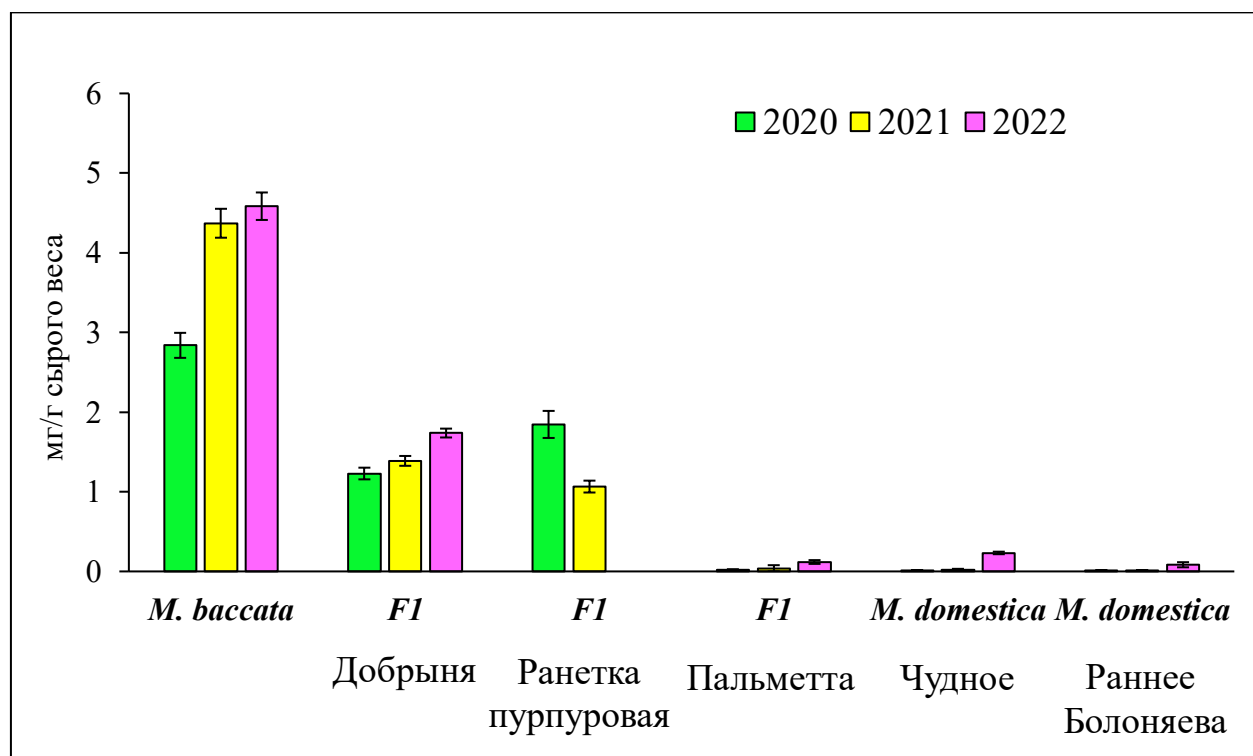


Рисунок 14. Содержание АК в кожице плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

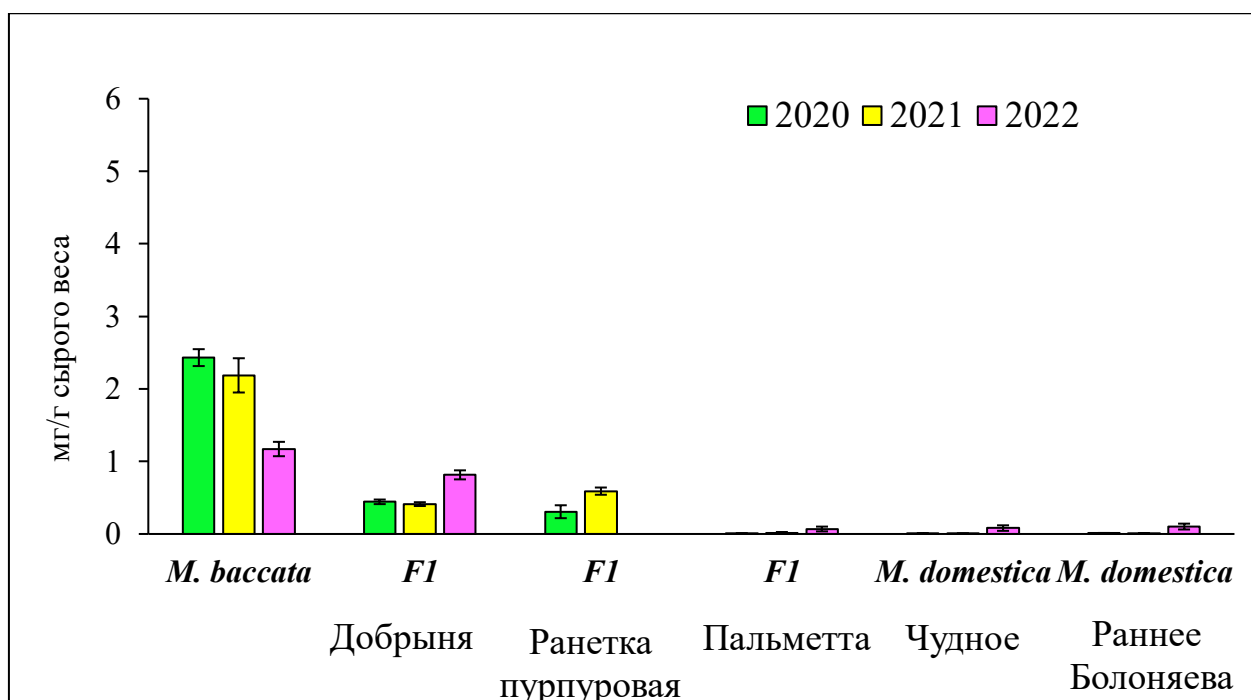


Рисунок 15. Содержание АК в мякоти плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В **2020** г. на этапе зрелости содержание АК регистрировали в тканях плодов *M. baccata*, оно было более 4,0 мг/г сырого веса в кожице и более 2,55 мг/г сырого веса в мякоти (рис. 16, 17).

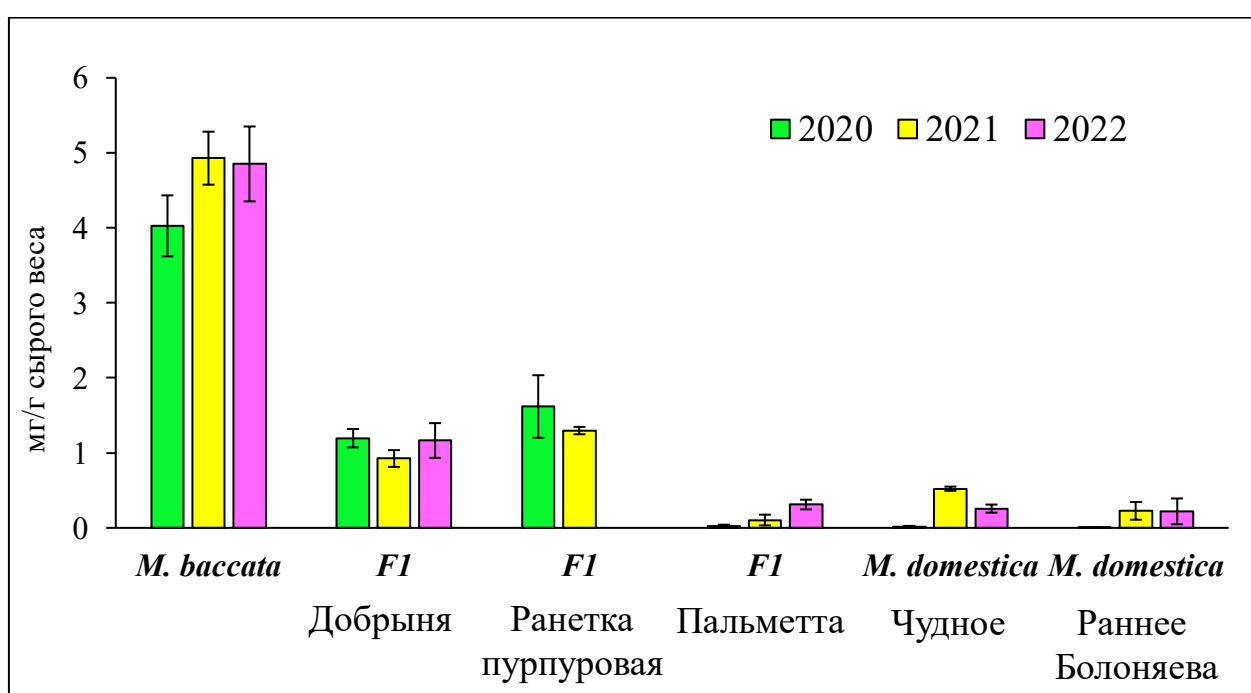


Рисунок 16. Содержание АК в кожице плодов *M. baccata*, гибридов F1, генотипов *M. domestica* на 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В 2020 г, в мякоти генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая было отмечено довольно высокое содержание АК — до 0,46 мг/г сырого веса. Такое содержание АК достигалось у этих генотипов на 2-м этапе развития плодов и оставалось высоким к этапу зрелости. Ткани генотипа Пальметта во все три года эксперимента отличались низким содержанием АК и в кожице, и в мякоти.

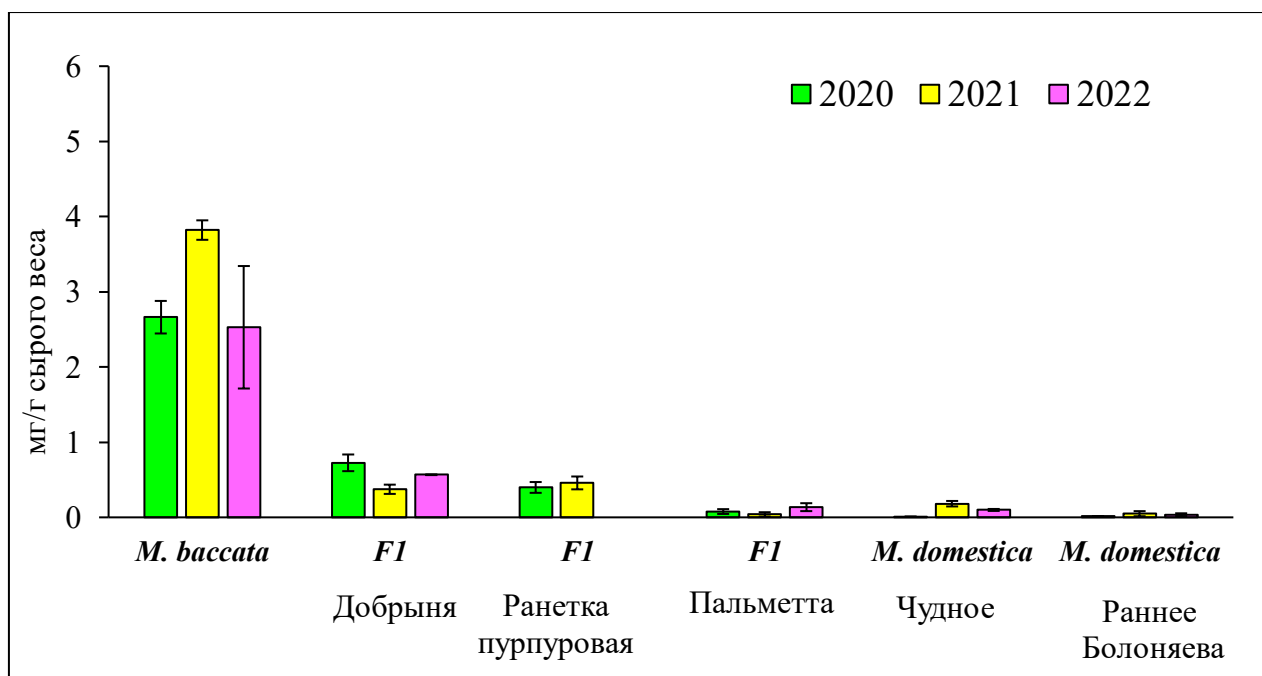


Рисунок 17. Содержание АК в мякоти плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Содержание АК в тканях генотипа Пальметта в 2021 году было самым высоким, этот показатель достигал 0,3 мг/г сырого веса в кожице и 0,1 мг/г сырого веса в мякоти. Однако оно оставалось низким по сравнению с другими гибридами F1 и *M. baccata*.

В **2021** году на 3-м этапе развития плодов регистрировали значительное увеличение содержания АК в тканях генотипа Чудное. Однако это значение было в несколько раз ниже, по сравнению с содержанием АК в плодах *M. baccata* и двух других ее гибридов F1. Накопление АК в тканях генотипа Раннее Болоняева, отличалось от такового в 2020 г.: на 1-м этапе содержание АК было крайне низким, а к 3-му этапу наблюдали увеличение АК до 0,2 мг/г сырого веса в кожце, до $0,05 \pm 0,03$ мг/г сырого веса в мякоти.

В **2022** году динамика накопления АК в тканях плодов на 3-м этапе была схожей с таковой в предыдущие периоды. Наиболее высокое содержание АК снова было отмечено в тканях *M. baccata*. На 3-м этапе этот показатель достигал 4,9 мг/г сырого веса в кожце и 2,5 мг/г сырого веса в мякоти.

Содержание АК в кожце было на одном уровне с содержанием в 2021 г. и выше, чем в 2020 г. Содержание АК в мякоти было ниже, чем в 2020-2021 гг.

В тканях генотипа Чудное содержание АК на 2-м и 3-м этапах отличалось минимально — значения оставались в пределах около 0,20 мг/г сырого веса в кожце и 0,10 мг/г сырого веса в мякоти. В мякоти генотипа Раннее Болоняева на 3-м этапе происходило уменьшение содержания АК.

На всех исследованных этапах развития плодов за всё время эксперимента содержание АК в тканях генотипов *M. baccata*, Добрыня, Ранетка пурпуровая было существенно выше, чем среднее референтное значение содержания АК в *M. domestica*. В тканях плодов *M. baccata* он достигало 4,4 мг/г сырого веса в кожце и 3 мг/г сырого веса — в мякоти. Кроме того, в тканях *M. baccata* содержание АК было высоким, начиная уже с 1-го этапа развития, и увеличивалось к 3-му этапу развития плодов. В мякоти двух гибридов F1 — генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая было показано относительно высокое содержание АК — 0,42–0,57 мг/г сырого веса, однако оно было значительно меньше (более чем в 5 раз) такового в мякоти *M. baccata*. Такое содержание АК достигалось на 2-м этапе развития плодов и к 3-му этапу значительно не увеличивалось.

Накопление АК в тканях генотипа Пальметты существенно отличалось от такового в тканях генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая, хотя этот генотип также является гибридом F1. Для него было показано низкое содержание АК во тканях начиная с 1-го этапа развития плодов. В зрелой мякоти накапливалось около 0,03 мг/г сырого веса.

На 3-м этапе низкое содержание АК в мякоти также было обнаружено у генотипов Чудное, Раннее Болоняева. Для всех исследованных генотипов было характерно более высокое содержание АК в коже, чем в мякоти. В тканях плодов *M. baccata* и двух ее гибридов F1 (Добрыня и Ранетка пурпуровая) содержание АК существенно превышало значение содержания АК в плодах генотипов *M. domestica* (Чудное и Раннее Болоняева) и гибрида F1 Пальметта на всех стадиях развития плодов.

Исследуемые генотипы имели четко выраженные различия в динамике накопления и поддержания высокого уровня АК (рис. 18, 19).

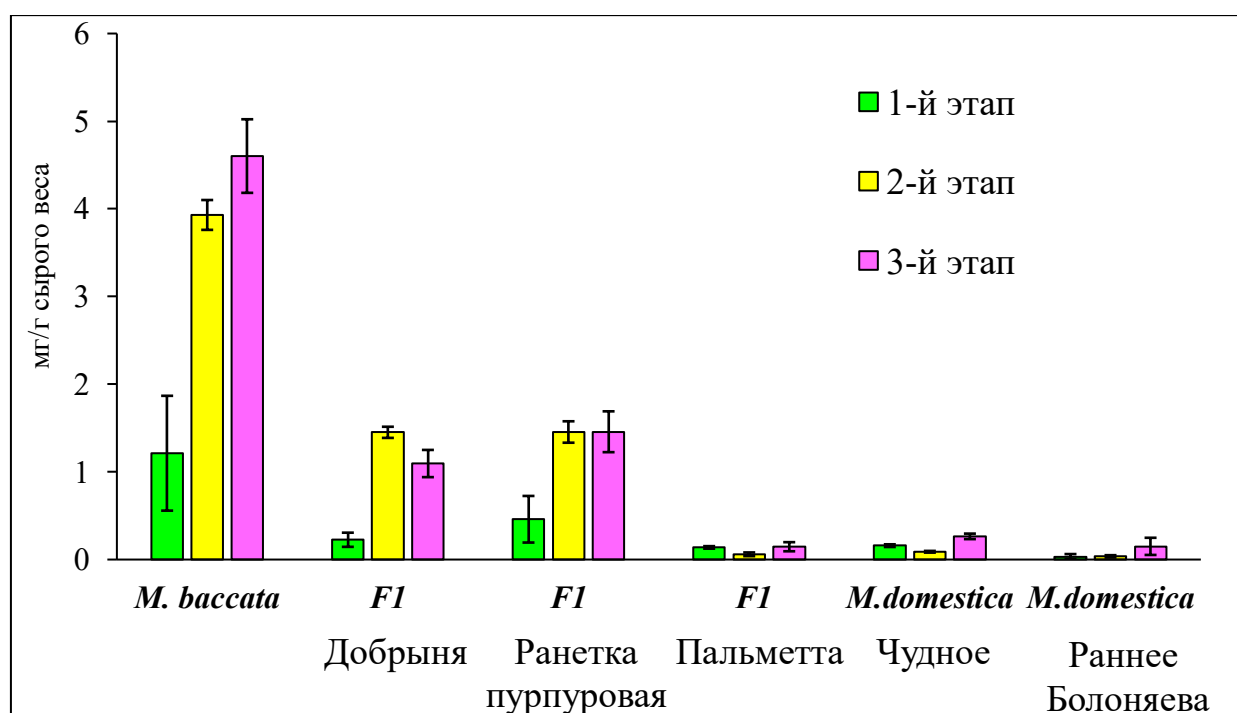


Рисунок 18. Динамика накопления АК в коже плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 3-х этапах развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

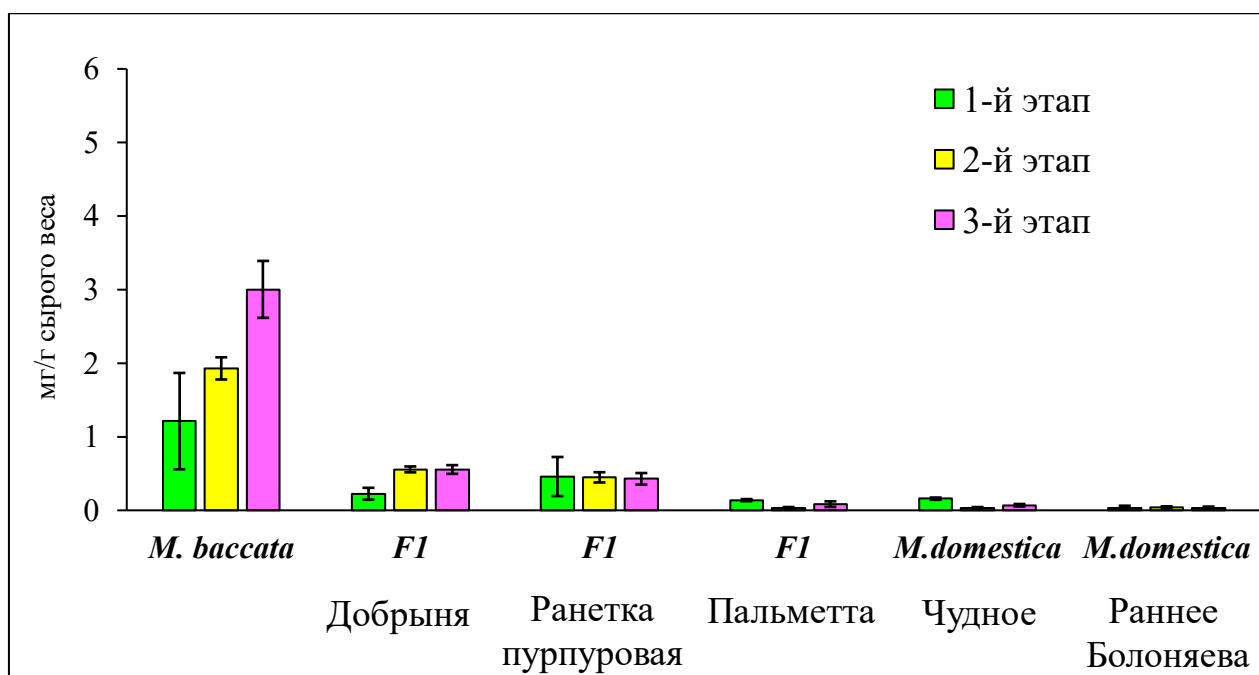


Рисунок 19. Динамика накопления АК в мякоти плодов *M. baccata*, гибридов *F1*, *M. domestica* на 3-х этапах развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В тканях плодов *M. baccata* процесс накопления АК начинался на 1-м этапе развития плодов и продолжался до зрелости в кожице, и, что особенно важно отметить, в мякоти. В тканях плодов генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая содержание АК не подвергалось значительным изменениям после 2-й стадии развития плодов. В тканях генотипов, которые характеризовались низким содержанием АК на 1-м этапе — Пальметта, Чудное, Раннее Болоньева, на 3-м этапе не регистрировали значительного увеличения АК как в кожице, так и в мякоти. Следовательно, уже на ранних этапах развития плодов существует возможность определения генотипов с тенденцией к накоплению большого содержания АК на этапе зрелости. Плоды *M. baccata*, по-видимому, обладают особыми, отличными от всех других генотипов, способами накопления и поддержания высокого содержания АК в тканях на всех стадиях развития.

В тканях изученных генотипов не было выявлено эффекта резкого снижения содержания АК после 1-го этапа развития плодов, как это описано

для *M. domestica* в работах Fang et al., 2017; Li et al. 2008. Можно предположить, что разная динамика накопления содержания АК в процессе вегетации плодов яблони является видо– и сортоспецифичной и, возможно, зависит от условий произрастания.

3.2. Относительная экспрессия генов *GGP1*, *GGP3*, *DHAR3*, *MDHAR1* в тканях на разных стадиях развития плодов

На сегодняшний день L-галактозный путь считается основным путем биосинтеза АК в клетках растений, он включает в себя десять стадий.

Регуляторной точкой синтеза АК в L-галактозном пути является превращение L-галактозы в галактозо-1-Ф с помощью фермента галактозофосфорилазы, кодируемого генами *GGP*. Работа галактозофосфорилазы имеет ключевое значение для образования АК. Активность этого фермента регулируется в зависимости от потребностей клетки в синтезе полисахаридов клеточной стенки (Тяпкина и др., 2019). Современные данные свидетельствуют о том, что *GGP* является контрольной точкой в пути биосинтеза АК у многих видов растений, таких как: арабидопсис, яблоня, томат, киви (Mellidou, Kanellis, 2017). Известно, что содержание АК в органах и тканях растений зависит как от ее биосинтеза, так и от процесса рециркуляции. В ходе рециркуляции окисленные формы восстанавливаются до АК при помощи двух редуктаз: монодегидроаскорбатредуктазы (МДГАР) и дегидроаскорбатредуктазы (ДГАР), кодируемых генами *MDHAR* и *DHAR* (Li et al., 2011). Для экспрессии этих генов показана взаимосвязь с накоплением АК в плодах *M. domestica* (Li et al., 2011; Mellidou et al., 2012).

Таким образом, для понимания особенностей регуляции АК в тканях плодов *M. baccata* и её гибридов необходимо было исследовать относительную экспрессию генов *GGP1*, *GGP3*, *DHAR*, *MDHAR* на разных стадиях развития плодов.

В тканях всех генотипов наблюдали значительное увеличение относительной экспрессии гена *GGP3* к стадии зрелости, однако корреляции с накоплением высокого содержания АК не обнаруживали (рис. 20).

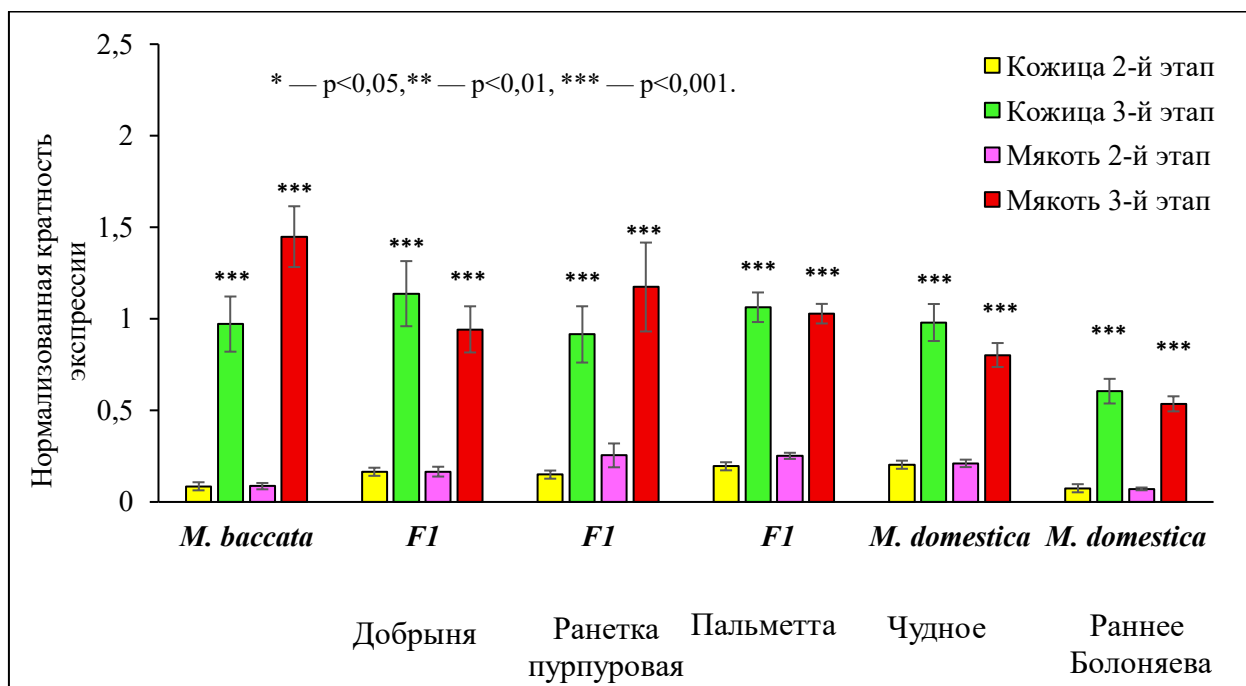


Рисунок 20. Динамика относительной экспрессии *GGP3* в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В тканях *M. baccata* наблюдали увеличение относительной экспрессии *GGP1* более чем в 2 раза на этапе зрелости плодов (рис. 21), которое сопровождалось увеличением содержания АК. Увеличение экспрессии этого гена в 1,5 раза было отмечено в коже генотипа Чудное на этапе зрелости, однако значимого увеличения АК при этом не наблюдали.

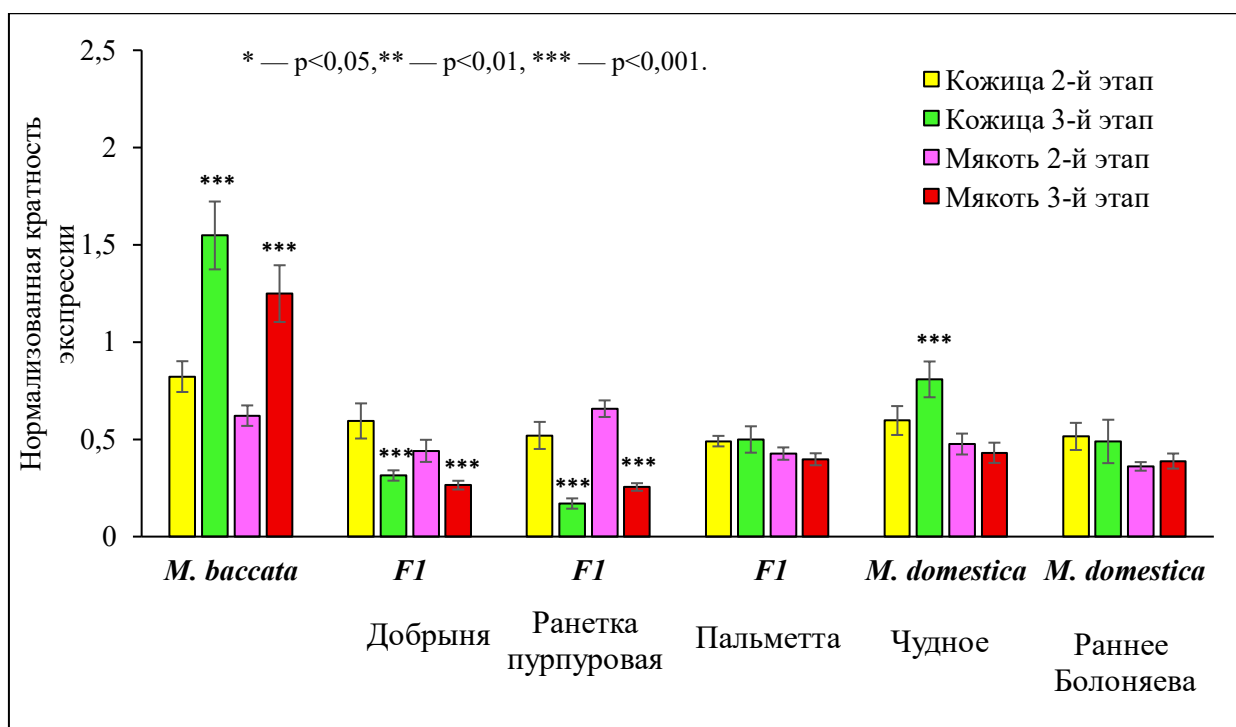


Рисунок 21. Динамика относительной экспрессии *GGP1* в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В тканях генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая происходило уменьшение относительной экспрессии *GGP1* на этапе зрелости.

Исходя из полученных результатов можно предположить, что значительное увеличение экспрессии гена *GGP1* может являться показателем, ассоциированным с накоплением высокого уровня АК и указывающим на существование динамического лимита накопления АК.

В тканях плодов *M. baccata* относительная экспрессия *DHAR3* была незначительно выше такового *MDHAR3* на 2-м этапе развития плодов и к зрелости снижалась в 2 раза (рис. 22).

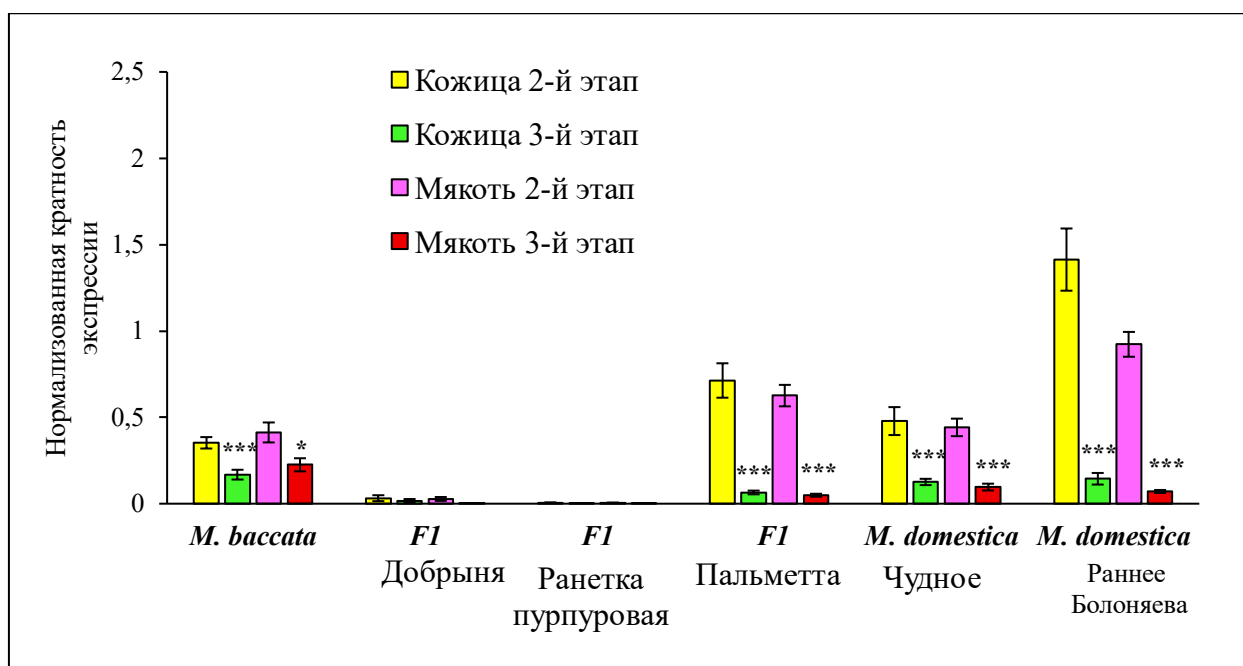


Рисунок 22. Динамика относительной экспрессии *DHAR3* в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Ткани генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая отличались минимальной относительной экспрессией гена *DHAR3*, достоверного снижения этого показателя к зрелости не происходило. Самый высокий уровень относительной экспрессии *DHAR3* наблюдали в коже и мякоти генотипов Раннее Болоньева, Пальметта на 2-м этапе развития плодов. К этапу зрелости относительная экспрессия этого гена снижалась: в тканях генотипа Раннее Болоньева более чем в 10 раз, в тканях генотипа Пальметта — более чем в 11 раз. Относительная экспрессия *DHAR3* в тканях плодов генотипа Чудного к зрелости была ниже примерно в 4 раза.

Исходя из результатов эксперимента можно сделать предположение, что *DHAR3* играет доминирующую роль в регуляции процесса рециркуляции АК на 2-м этапе развития плодов низковитаминных генотипов, таких как Пальметта, Чудное, Раннее Болоньева, однако не является показателем накопления высокого уровня содержания АК.

Относительная экспрессия гена *MDHAR1* достоверно увеличивалась к зрелости как в коже, так и в мякоти генотипов *M. baccata*, Добрыня, Пальметта, Чудное (рис. 23).

Относительная экспрессия гена *MDHAR1* на стадии зрелости во всех тканях плодов *M. baccata* более чем в 7 раз превышала таковую у остальных генотипов. Экспрессия *MDHAR1* в плодах *M. baccata* коррелировала с высоким содержанием АК, коэффициент корреляции составил 0,75. Генотипы Ранетка пурпуровая и Раннее Болоняева отличались достоверным увеличением уровня относительной экспрессии на этапе зрелости только в мякоти. У всех остальных изученных генотипов на этом этапе в мякоти относительная экспрессия этого гена повышалась незначительно, в том числе и у низковитаминных генотипов (Пальметта, Чудное, Раннее Болоняева).

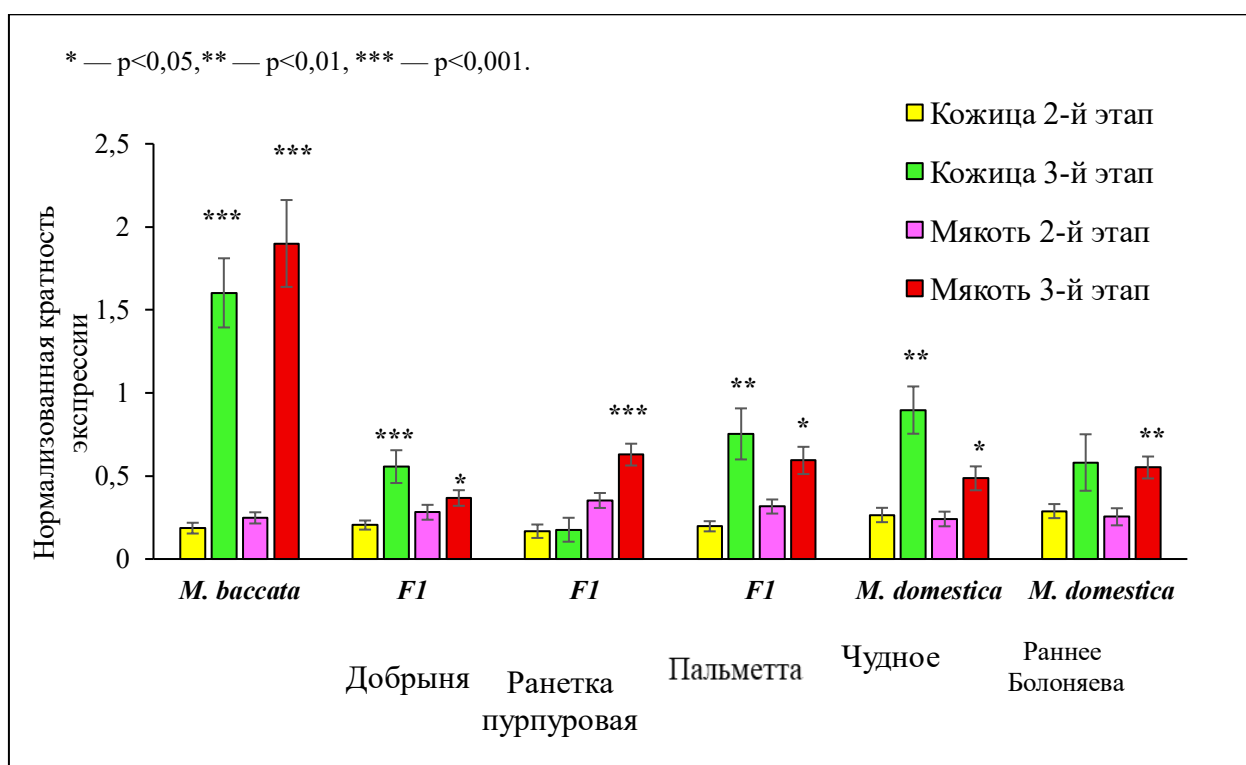


Рисунок 23. Динамика относительной экспрессии *MDHAR1* в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Согласно полученным результатам, логично предположить, что в тканях *M. baccata* основную роль в рециркуляции АК на этапе зрелости выполняет *MDHAR1*. В тканях генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая экспрессия *DHAR3* минимальной и на 2-м, и на 3-м этапах развития плодов. Относительная экспрессия *MDHAR1* на 2-м этапе развития плода была выше, чем *DHAR3* и к зрелости увеличивалась, как и в тканях *M. baccata*. Таким образом, гибриды F1, вероятно, частично наследуют эту особенность путей обеспечения уровня содержания АК в тканях плодов.

DHAR3 играет основную роль в рециркуляции АК на 2-м этапе развития плодов генотипов Пальметта, Чудное, Раннее Болоньева. Вероятно, доминирование того или иного гена, регулирующего процесс рециркуляции, является видо- и сортоспецифичным.

По результатам этого эксперимента можно предположить, что значительное, в несколько раз, увеличение относительной экспрессии *MDHAR1* к 3-му этапу развития плодов является одним из признаков, связанных с высоким содержанием АК. Что, в свою очередь, делает *MDHAR1* перспективным геном-кандидатом для использования в маркерной селекции.

3.3. Анализ удельной активности ферментов рециклинга АК в тканях на разных стадиях развития плодов

АК в растительной клетке участвует в аскорбат-глутатионовом цикле, защищающим клетку от окислительного стресса (Suekawa et al., 2018). Первым этапом этого цикла является детоксикация АФК с помощью аскорбатпероксидазы (АПО), реже аскорбатоксидазы (АО). В результате образуется монодегидроаскорбат (МДГА), который восстанавливается до АК с помощью фермента МДГАР, либо дегидроаскорбат (ДГА), который восстанавливается ферментом ДГАР. Активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла неодинакова и динамично изменяется в зависимости от комплекса факторов. Следует отметить, что в плодах различных видов растений всегда присутствует ведущий (доминирующий) фермент, вносящий

основной вклад в восстановление окисленных форм АК (Li et al., 2011). В плодах *M. domestica* доминирующую роль в поддержании рециркуляции АК выполняет ДГАР (Li et al., 2011).

На 1-м этапе развития плодов всех генотипов активность ДГАР была минимальной, активность АПО — максимальной (рис. 24).

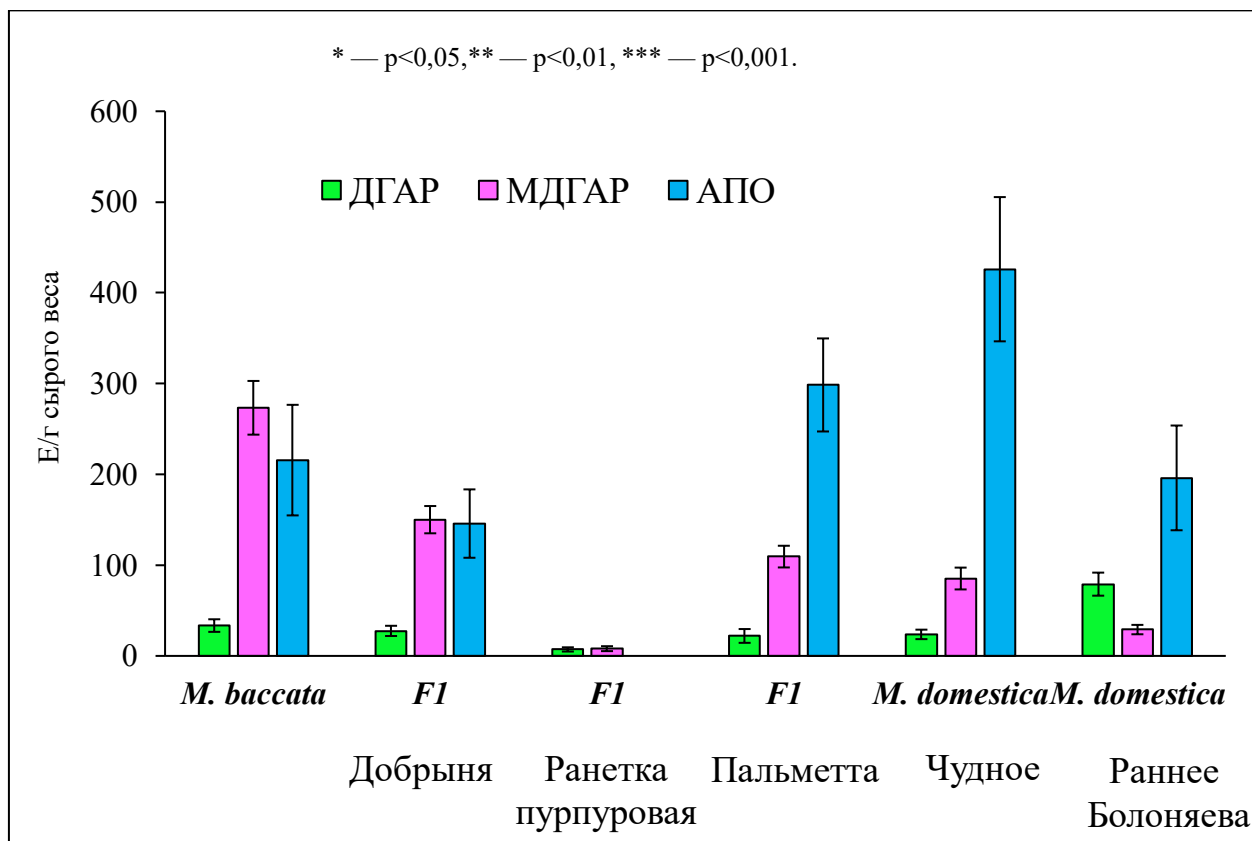


Рисунок 24. Удельная активность ферментов ДГАР, МДГАР, АПО в тканях целых плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 1-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные ошибки среднего.

Активность МДГАР была максимальной в плодах *M. baccata*, в плодах гибридов F1 и генотипов *M. domestica* она была заметно ниже. Минимальную активность ДГАР и МДГАР на 1-м этапе развития наблюдали в плодах генотипа Ранетка пурпуровая.

В тканях генотипа *M. baccata* активность ДГАР в мякоти была ниже, чем в коже, как на 2-м этапе развития, так и на этапе зрелости. В тканях генотипа Добрыня активность этого фермента на 2-м этапе развития плодов была низкой и оставалась таковой к зрелости плодов. На этапе зрелости наблюдали повышение активности фермента ДГАР в мякоти генотипов Ранетка пурпуровая, Пальметта, Чудное. В мякоти генотипа Раннее Болоньева, напротив, наблюдали снижение активности ДГАР.

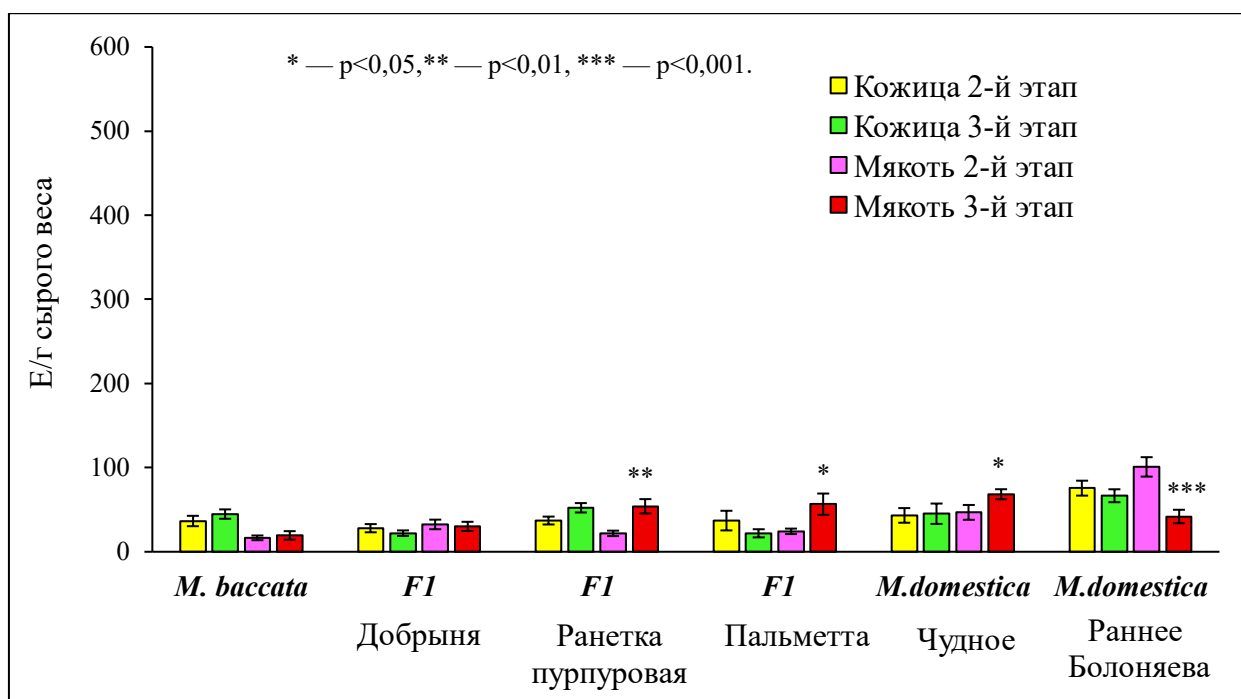


Рисунок 25. Динамика удельной активности фермента ДГАР в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные ошибки среднего. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

На 2-м этапе развития плодов наибольшую активность МДГАР наблюдали как в коже, так и в мякоти *M. baccata* (рис. 26). На этапе зрелости активность МДГАР оставалась достаточно высокой в коже плодов и уменьшалась в мякоти.

Также повышенную активность данного фермента наблюдали в мякоти генотипа Добрыня на 2-м этапе развития плодов. К зрелости активность

МДГАР в мякоти этого генотипа снижалась. В тканях генотипа Ранетка пурпуровая активность МДГАР на 2-м этапе развития плодов практически не отличалась от таковой на этапе зрелости. В кожце генотипа Пальметта регистрировали повышение активности МДГАР к зрелости, в мякоти этого генотипа этот показатель не изменялся. В мякоти генотипа Чудное к 3-му этапу развития значительно снижалась активность МДГАР.

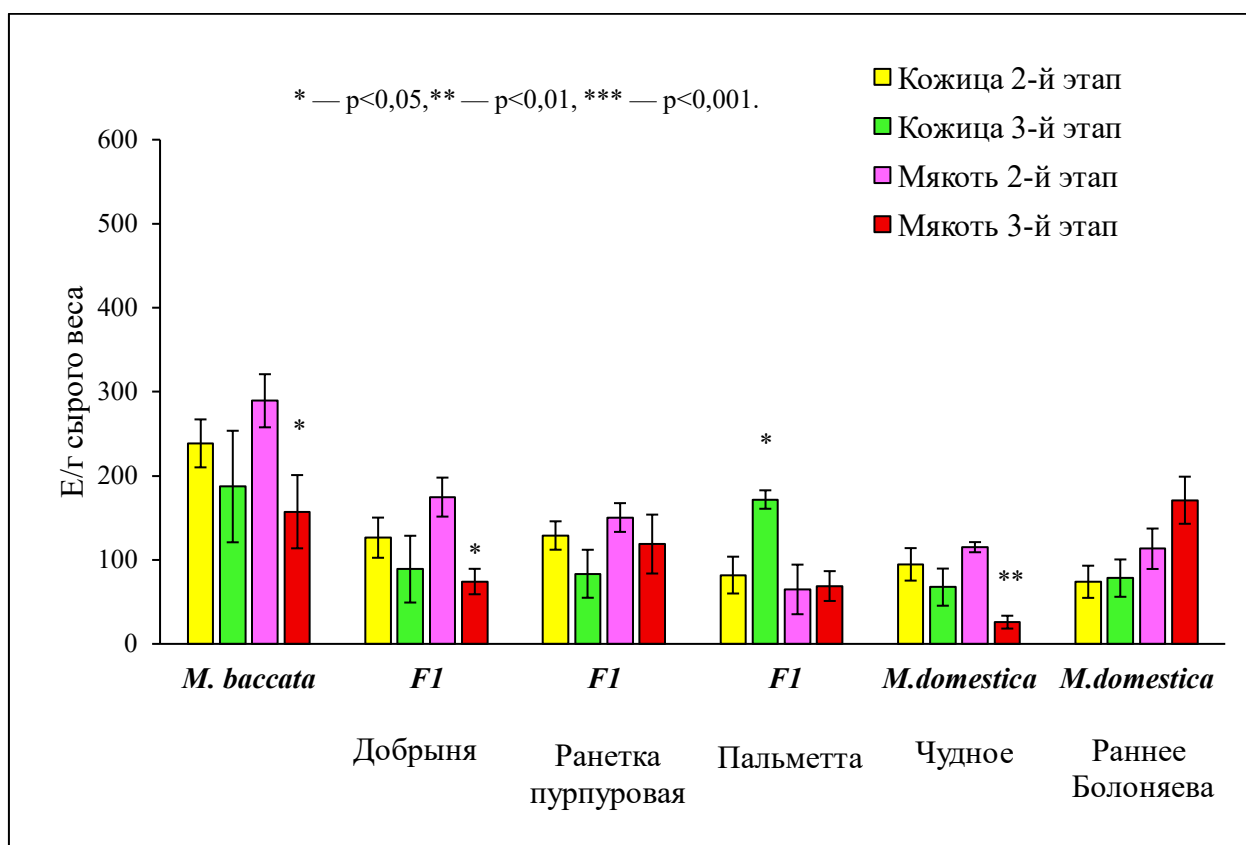


Рисунок 26. Динамика удельной активности фермента МДГАР в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м и 3-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные ошибки среднего. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

В тканях *M. baccata* на 2-м этапе развития плодов активность АПО в кожце и мякоти была на одном уровне (рис. 27). К этапу зрелости этот показатель менялся незначительно. В мякоти генотипа Добрыня к стадии зрелости наблюдали снижение активности АПО. Мякоть генотипа Ранетка пурпуровая отличалась высокой активностью АПО относительно других

генотипов, как на 2-м этапе развития, так и на этапе зрелости. В кожце генотипа Пальметта к стадии зрелости наблюдали значительное уменьшение активности данного фермента. Снижение активности АПО также наблюдали в мякоти генотипов *M. domestica* на этапе зрелости плодов.

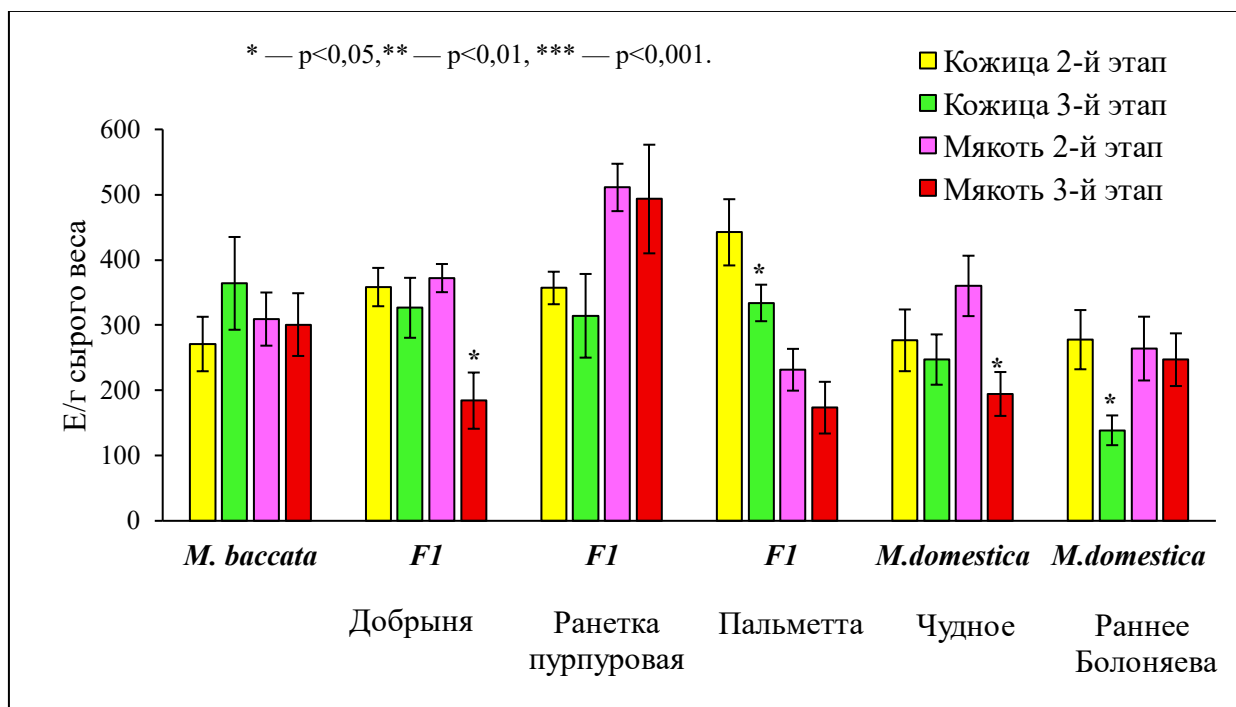


Рисунок 27. Динамика удельной активности АПО в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* в 2020-2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные ошибки среднего. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

В результате анализа динамики активности ферментов аскорбат-глутатионного цикла в тканях плодов было выявлено несколько закономерностей. Во-первых, наибольшей активностью на всех стадиях вегетации исследуемых генотипов обладал фермент аскорбатпероксидаза, наименьшей активностью — дегидроаскорбатредуктаза.

Высокая активность ДГАР наблюдалась в тканях генотипа Раннее Болоньяева на 2-м этапе развития плодов. В тканях *M. baccata*, напротив, наблюдалась высокая активность МДГАР. На этапе зрелости в тканях *M. baccata* активность МДГАР сопровождалась повышением относительной

экспрессии *MDHAR1*. Во всех тканях *M. baccata* на этапе зрелости высокая активность МДГАР коррелировала с содержанием АК ($K=0,72$)

Повышенная экспрессия гена *MDHAR1* и высокая активность фермента МДГАР является, вероятно, наиболее эффективной стратегией для поддержания высокого уровня АК т.к. ДГА, являясь более нестабильной молекулой чем МДГА, может необратимо гидролизироваться до 2,3-дикето-1-гулоната (ДКГ) или подвергнуться спонтанному окислению до щавелевой, L-винной или L-треоновой кислоты (Buettner, Schafer, 2000; Dewhirst, Fry, 2018), что ведет к уменьшению содержания АК и необходимости нового цикла синтеза. Обобщая вышесказанное, можно предположить, что ген *MDHAR1* является перспективным геном-кандидатом для маркерной селекции.

3.4. Содержание углеводов и пектинов в тканях на разных стадиях развития плодов

Содержание углеводов

Необходимо отметить, что синтез АК напрямую зависит от синтеза растворимых сахаров. Недостаток растворимых сахаров-предшественников синтеза АК, таких как сорбит, глюкоза, фруктоза и глюкоза, вероятно, может быть, одной из причин накопления низких уровней АК в тканях плодов.

На 1-м этапе развития плодам необходимо обеспечение транспортными сахарами — сорбитолом и/или сахарозой. (рис. 28). В тканях *M. baccata* наблюдали впечатляюще высокое содержание как сорбитола — более 4,5 мг/г сырого веса, так и сахарозы — более 3,0 мг/г сырого веса. Содержание фруктозы и глюкозы было минимальным среди всех исследованных генотипов.

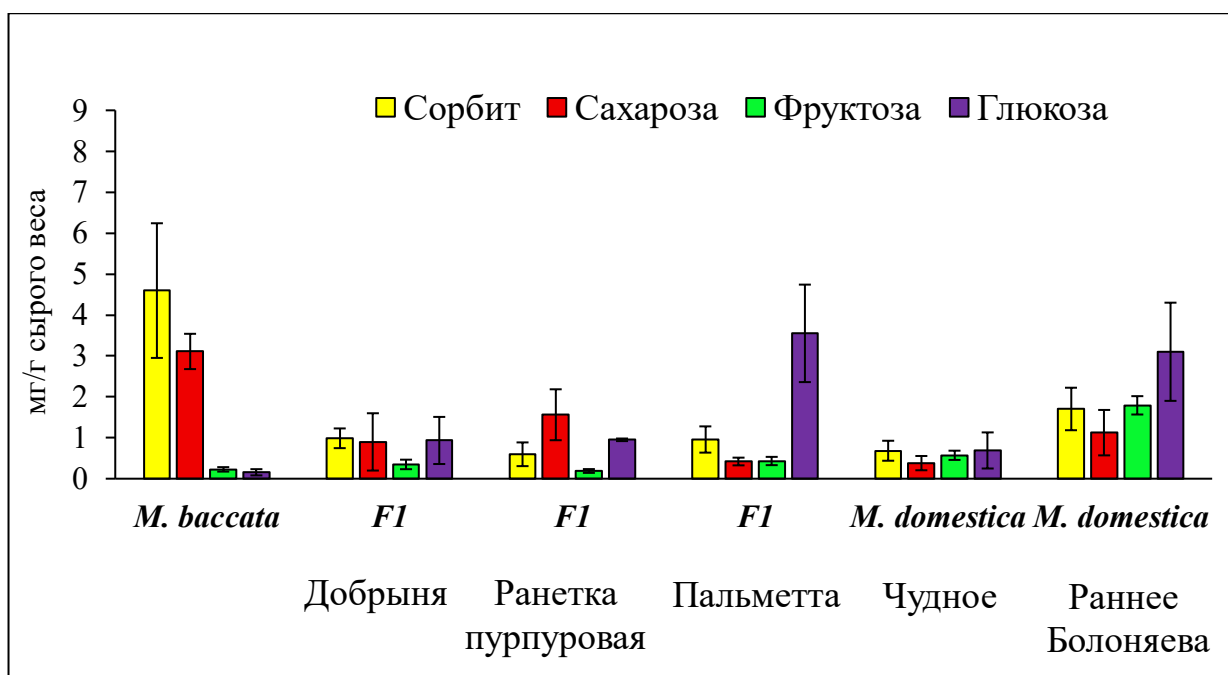


Рисунок 28. Содержание растворимых сахаров в тканях плодов *M. baccata*, гибридов *F1*, *M. domestica* на 1-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

В тканях генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая на этом этапе развития плодов соотношение растворимых сахаров было схожим, в тканях обоих генотипов наблюдали невысокое относительно других сахаров содержание фруктозы. В тканях генотипа Пальметта и Раннее Болоньева регистрировали высокий уровень глюкозы, что не характерно для 1-й стадии развития плодов яблони. Наименьшее суммарное содержание растворимых сахаров отмечали в тканях генотипа Чудное.

На 2-м этапе развития плодов в кожице *M. baccata* наблюдали уменьшение содержания сорбитола и сахарозы и незначительно увеличение содержания фруктозы и глюкозы, что, по-видимому, свидетельствовало об активном их использовании растением для построения клеточных стенок и синтеза необходимых соединений, включая АК (рис. 29).

В кожице генотипов Добрыня и Пальметта наблюдали увеличение фруктозы, в то время как в кожице генотипа Ранетка пурпуровая увеличивалось содержание сахарозы.

В коже генотипа Чудное наблюдали значительное увеличение содержания и сахарозы, и фруктозы, в то время как в коже генотипа Раннее Болоньева эти содержание этих РС практически не изменялось, но уменьшался уровень глюкозы.

В мякоти *M. baccata* также наблюдали уменьшение содержания всех растворимых сахаров (рис. 30). Однако уровень сорбитола в тканях генотипов *M. baccata* и Добрыня продолжал оставаться высоким относительно такового других генотипов. В мякоти остальных генотипов суммарное содержание растворимых сахаров было выше, чем в коже. Наибольшее содержание суммарных растворимых сахаров, а также высокое содержание фруктозы (более 3,0 мг/г сырого веса) на 2-м этапе развития плодов регистрировали в мякоти генотипов Чудное и Раннее Болоньева.

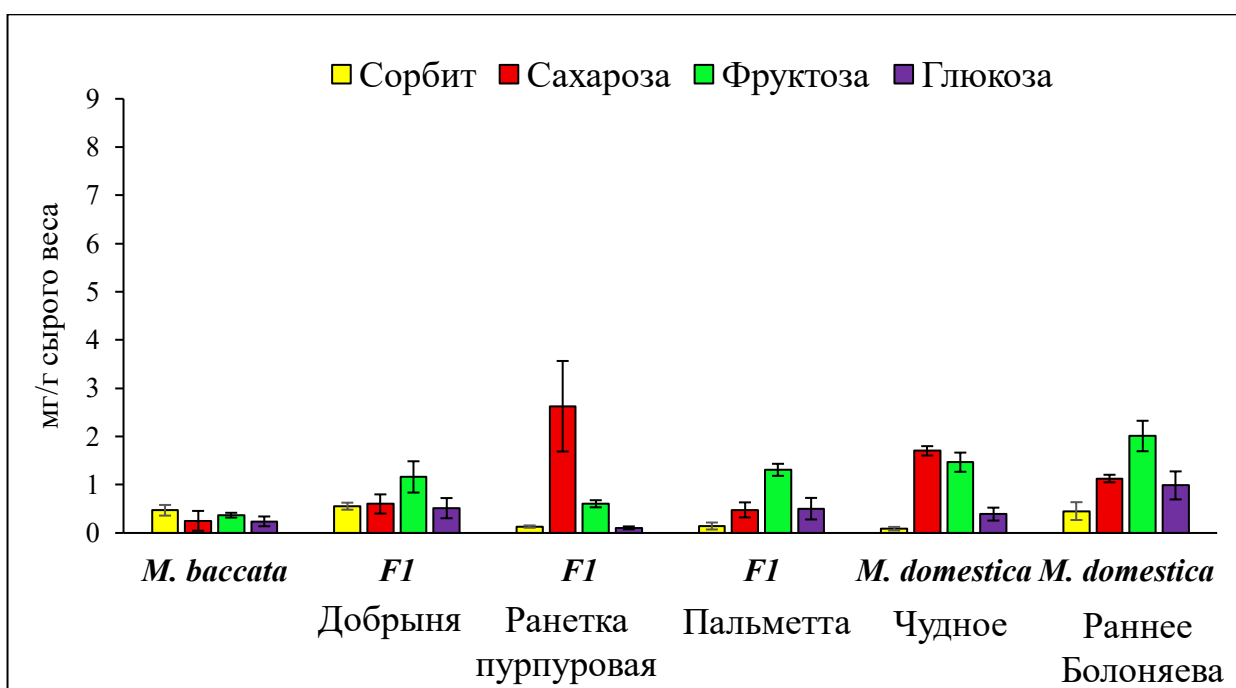


Рисунок 29. Содержание растворимых сахаров в коже плодов *M. baccata*, гибридов *F1*, *M. domestica* на 2-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

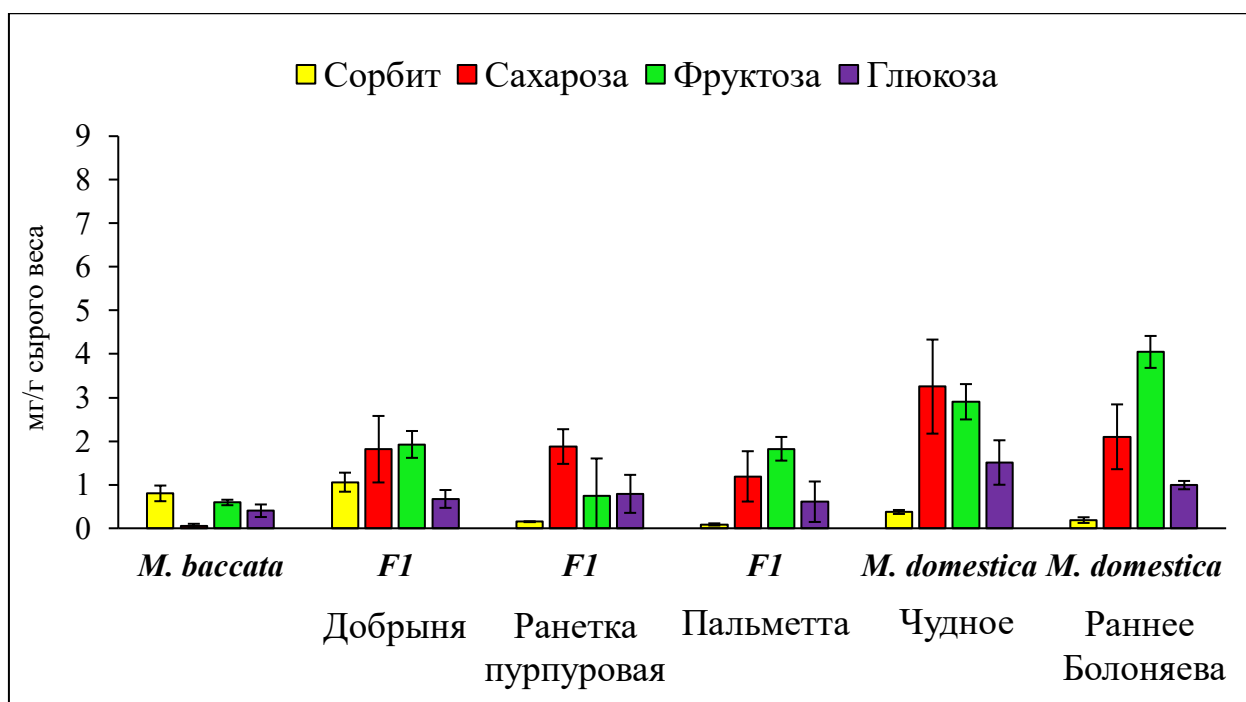


Рисунок 30. Содержание растворимых сахаров в мякоти плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 2-м этапе развития плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

На стадии зрелости в коже *M. baccata* и генотипа Ранетка пурпуровая содержание сорбитола и сахарозы продолжало оставаться высоким (рис. 31).

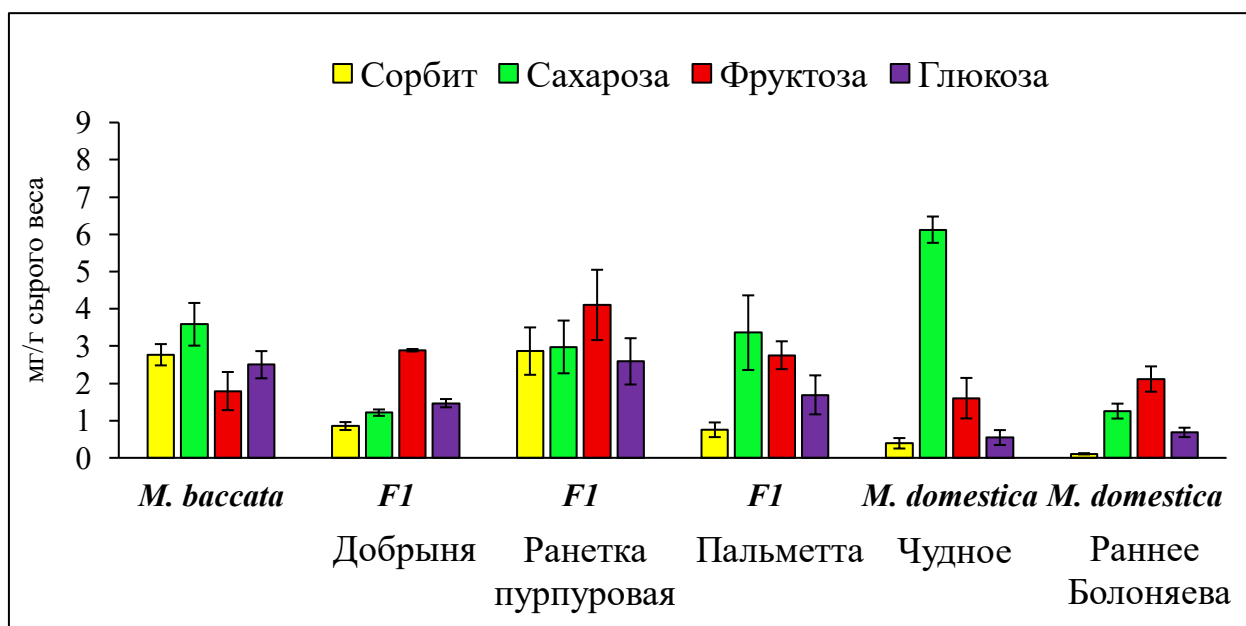


Рисунок 31. Содержание растворимых сахаров в кожице плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на этапе зрелости плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

В кожице генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая на этом этапе отмечали увеличение содержания глюкозы и фруктозы. Кожица генотипа Чудное отличалась высоким содержанием сахарозы. Минимальное содержание суммарных растворимых сахаров наблюдали в кожице Раннего Болоняева.

В мякоти *M. baccata* отмечали относительно высокое содержание глюкозы, а также транспортных форм сахаров — сахарозы и сорбита, что, по-видимому, является видоспецифичным признаком *M. baccata* (рис. 32). Интересно отметить, что в мякоти *M. baccata* регистрировали наибольшее суммарное содержание растворимых сахаров.

В мякоти остальных генотипов на 3-м этапе развития плодов отмечали накопление высокого содержания глюкозы и фруктозы. Содержание сорбитола в мякоти *M. baccata* было максимальным относительно других генотипов. В мякоти генотипа Раннее Болоняева содержание сорбитола к зрелости было минимальным.

В мякоти Чудного и Раннее Болоняева наблюдали накопление фруктозы, содержание глюкозы к зрелости уменьшалось.

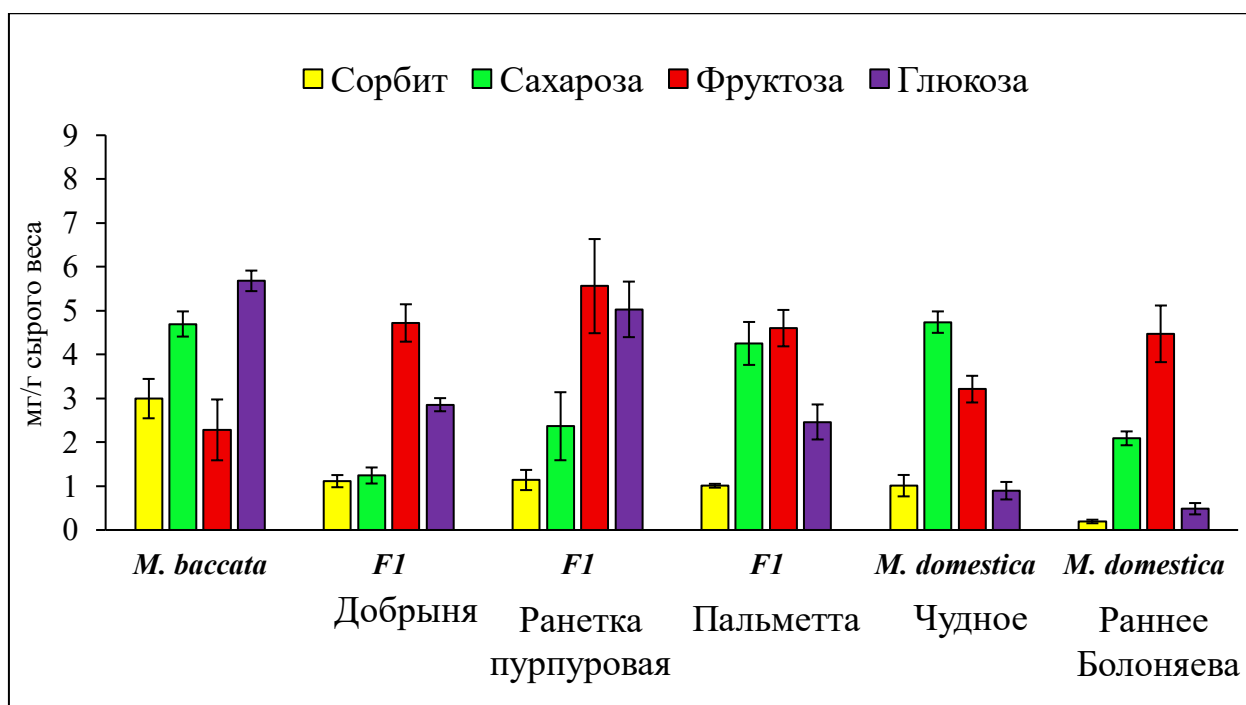


Рисунок 32. Содержание растворимых сахаров в мякоти плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на стадии зрелости плодов в 2020-2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

Общеизвестно, что на ранних стадиях развития плодов растворимые сахара необходимы для поддержания активного деления и роста клеток, и плоды на ранних этапах развития становятся мощным, аттрагирующим сахара и другие питательные вещества, органом (Tijero et al., 2021). В плодах, отобранных на 1-м этапе развития плодов, обнаружено накопление в большей степени транспортных форм сахаров, таких как сорбитол и сахароза. Уже на этом этапе отмечали некоторые особенности накопления и распределения растворимых сахаров. Так, в тканях плодов *M. baccata* наблюдали самое высокое содержание сорбитола – более 4 мг/г сырого веса. В тканях плодов генотипов Пальметта и Раннее Болоняева наблюдали накопление глюкозы, что не характерно для раннего этапа развития плодов яблони (Tijero et al., 2021).

На 2-м этапе развития плодов различия в содержании растворимых сахаров в кожуре и мякоти, а также между генотипами становилось более выраженными.

К зрелости происходило смещение в сторону накопления фруктозы и/или глюкозы, что является характерным для плодов яблони (Tijero et al., 2021). Однако, в тканях *M. baccata* содержание сорбитола оставалось самым высоким среди всех исследуемых генотипов. Предположительно, высокий уровень содержания сорбитола в тканях *M. baccata* является видоспецифичным показателем и частично наследуется гибридами F1.

Содержание пектинов

Пектины – полисахариды клеточных стенок растений. Пектины связаны с путем Смирнова-Уилера через общие метаболиты – маннозу и L-галактозу, в регуляторной точке биосинтеза АК. Продукты деградации клеточных стенок могут служить субстратом для галактуронового пути синтеза АК. Деградация клеточных стенок плодов происходит как при достижении стадии зрелости, так и при воздействии стрессоров, таких как низкие температуры или патогены (Lionetti et al., 2012; Ставицкая и др., 2025). Галактуроновый путь синтеза значительно короче L-галактозного, что, вероятно, позволяет быстро накапливать высокий уровень содержания АК при формировании ответа на стрессор. Подтверждением этой гипотезы является то, что АК неферментативным путем способна разрушать пектин клеточных стенок (Dumville, Fry 2003; Arancibia, 2006). АК, либо в присутствии H_2O_2 , либо ионов металлов, таких как Cu^{2+} , может солюбилизовать до 40% общего пектина *in vitro* из-за действия гидроксильных радикалов, генерируемых АК (Smirnoff, 2018; Arabia et al., 2024).

Соотношение пектиновых фракций в исследуемых генотипах было неодинаковым (рис. 33).

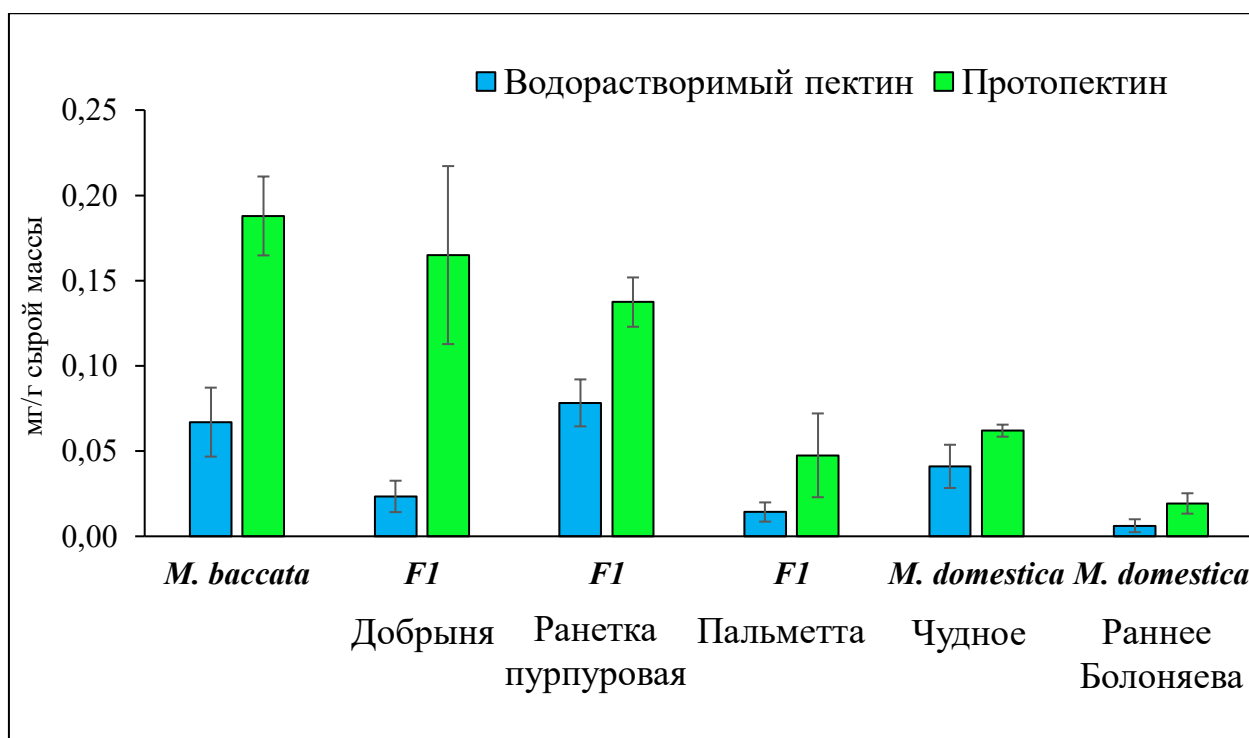


Рисунок 33. Содержание пектиновых фракций в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 3-м этапе развития плодов в 2020, 2022 гг.

Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

В тканях всех генотипов содержание водорастворимого пектина было ниже, чем протопектина. В плодах *M. baccata* отмечали максимальное общее содержание пектинов, до 0,26 мг/ г сырого веса. Минимальное суммарное содержание обеих фракций (водорастворимой и протопектина) пектиновых веществ наблюдали в тканях генотипа Раннее Болоньева. В тканях генотипов *M. baccata* и Добрыня наблюдали очень высокое содержание протопектинов и низкое — водорастворимых пектинов.

Степень этерификация протопектина и водорастворимого пектина во всех генотипах находилась примерно в одном диапазоне значений и варьировала от 54,0% в ВП генотипа Пальметта до 69,25% в ВП генотипа Ранетка пурпуровая (рис. 39).

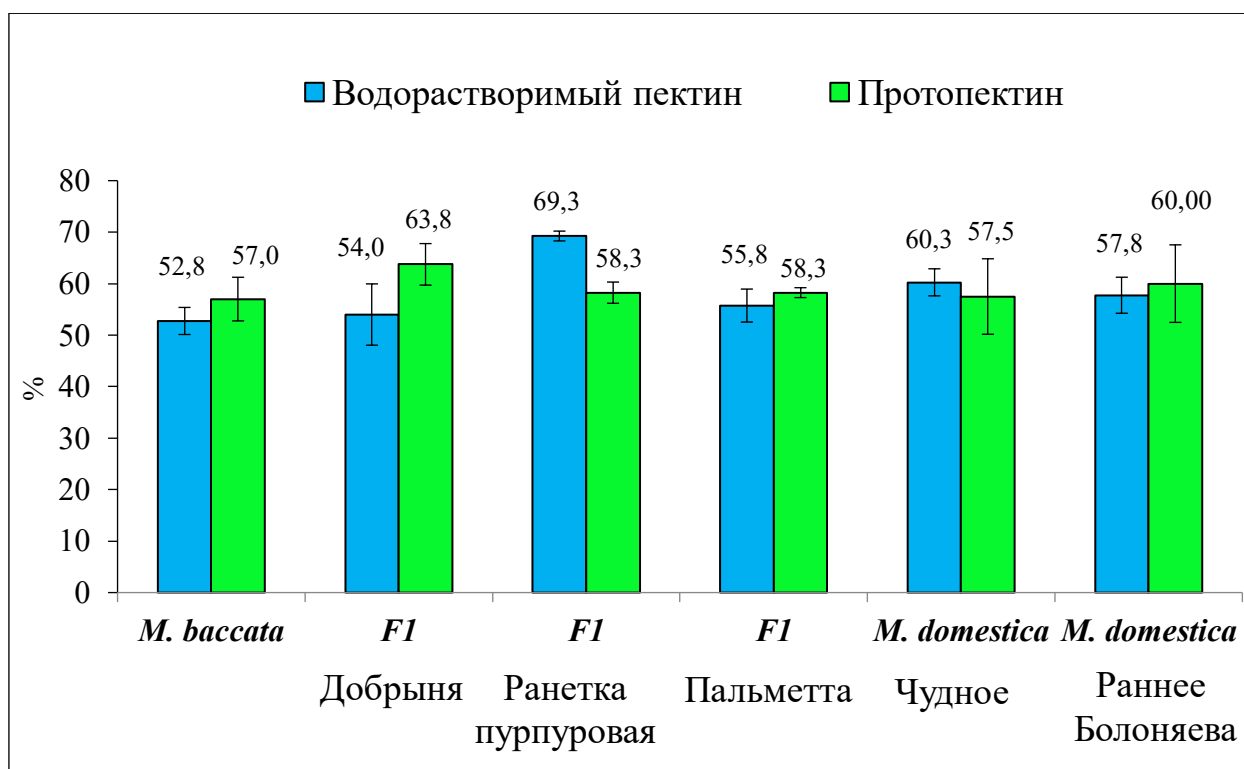


Рисунок 34. Степень этерификации пектиновых фракций, % в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica* на 3-м этапе развития плодов в 2020,2022 гг. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Наименьшей степенью этерификации отличался генотип *M. baccata* — 52,75% в водорастворимой фракции и 57% в протопектиновой фракции. Все пектиновые фракции были высокоэтерифицированными, степень их этерификации составляла более 50%.

Известно, что максимальное содержание пектинов регистрируется в растущих тканях. В процессе развития плодов содержание и соотношение пектиновых веществ неоднократно меняется и на этапе зрелости напрямую отвечает за созревание и мацерацию плодов (Atkinson et al., 2012). В связи с этим обращает на себя внимание тот факт, что содержание протопектинов в тканях исследуемых генотипов на этапе зрелости либо превосходит содержание водорастворимых форм пектина, либо примерно равно ему.

Этерификация пектиновых фракций в тканях плодов *M. domestica* не отличалась от таковой в тканях плодов *M. baccata* её гибридов F1. Таким

образом, интенсивность обеспечения пути «подхвата» пектина, по-видимому, зависит от активности ферментов деградации пектиновых цепей и не зависит от степени их этерификации.

3.5. Модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками различных путей синтеза АК («фидинг»)

Основным путём биосинтеза АК в тканях растений считается путь Смирнова-Уилера (Wheeler et al., 1998; Smirnoff, 2018). Наличие иного доминирующего пути синтеза АК является видоспецифичным, например, у клубники и киви (Smirnoff, Wheeler, 2000; Hancock, Viola, 2005). У разных растений в тканях плодов, помимо пути Смирнова-Уилера, может существовать один или более дополнительных путей биосинтеза, таких как, например, галактуроновый (путь «подхвата» пектина), который может работать постоянно или в ответ на стрессовое воздействие (Quiñones et al., 2024). Для изучения путей биосинтеза АК в различных растительных тканях применяется метод совместного инкубирования прекурсоров синтеза АК с исследуемыми тканями, т.н. метод фидинга (от англ. feeding – кормление, питание) — добавление к ткани плодов различных предшественников синтеза АК с целью изучения их участия в этом процессе (Li et al., 2008). Подобный подход активно применяется в изучении путей синтеза АК в тканях плодов яблок (Li et al., 2008; 2009), киви (Liao et al., 2021), и др. (Quiñones et al., 2024).

Для выявления возможных путей биосинтеза АК в плодах *M. baccata* и ее гибридов ткани плодов (кожицу и мякоть) обрабатывали предшественниками каждого метаболического пути синтеза АК: D-глюкозой, L-галактозой, L-галактоно-1,4-лактоном (путь Смирнова-Уилера), L-гулоно-1,4-лактоном, миоинозитолом, D-глюкуроновой кислотой (L-гулозный и миоинозитоловый пути) и D-галактуроновой кислотой, D-глюкуроновой кислотой (путь «подхвата» пектина), а затем измеряли содержание АК в инкубированных тканях. Контролем считали содержание АК в тканях после

инкубации с сахарозой. Положительным откликом считали увеличение содержания АК относительно контроля, отрицательным — уменьшение содержания АК относительно контроля.

Содержание АК в тканях, отобранных на 2-м этапе развития плодов, после инкубации с субстратами синтеза АК представлены в таблицах 5-7. Содержание АК в тканях, отобранных на 3-м этапе развития плодов, после инкубации с субстратами синтеза АК представлены в таблицах 8-10.

На 2-м этапе развития плодов в **2020** году в кожице *M. baccata* регистрировали положительный отклик на добавление галактуроновой кислоты в среду инкубации (Табл. 5). В мякоти этого генотипа положительный отклик наблюдали при добавлении галактозы и галактоно-1,4-лактона.

При добавлении в среду инкубации глюкозы и гулоно-1,4-лактона к тканям генотипа Добрыня в кожице было обнаружено повышение содержания АК, а в мякоти реакция была обратной. Также положительный отклик отмечали при добавлении к кожице этого генотипа галактозы. В кожице генотипа Ранетка пурпуровая повышение содержания АК вызывало добавление глюкозы, гулоно-1,4-лактона и галактозы. В мякоти не наблюдали откликов на добавление всех метаболитов-предшественников.

В кожице генотипа Пальметта наблюдали увеличение содержания АК при добавлении гулоно-1,4-лактона, галактозы, миоинозитола, галактоно-1,4-лактона. В мякоти этого генотипа при добавлении галактозы наблюдали положительный отклик.

При добавлении к кожице генотипа Чудное глюкозы, гулоно-1,4-лактона, миоинозитола, глюкуроновой кислоты наблюдали отрицательный отклик: уменьшение содержания АК относительно контроля, при добавлении галактуроновой кислоты — положительный. В мякоти этого генотипа при добавлении галактозы и миоинозитола регистрировали уменьшение уровня АК.

В тканях сорта Раннее Болоньева положительный отклик наблюдали в мякоти при добавлении глюкозы и миоинозитола в среду инкубации, отрицательный — при добавлении глюкуроновой кислоты.

На 2-м этапе развития плодов в **2021** году увеличение содержания АК происходило при совместной инкубации кожицы *M. baccata* с глюкозой и гулоно-1,4-лактоном. В мякоти этого генотипа откликов на добавление метаболитов-предшественников синтеза АК не регистрировали (Табл. 6).

В кожице генотипа Добрыня отмечали увеличение содержания АК в ответ на добавление галактозы, в мякоти — на добавление галактозы и глюкуроновой кислоты.

При добавлении к кожице генотипа Ранетка пурпуровая глюкозы, галактуроновой кислоты и галактоно-1,4-лактона наблюдали положительный отклик. При добавлении глюкуроновой кислоты к тканям мякоти реакция была отрицательной.

В кожице генотипа Пальметта увеличение содержания АК наблюдали в ответ на добавление миоинозитола и галактоно-1,4-лактона в среду инкубации. В мякоти не наблюдали реакции на добавление метаболитов-предшественников.

В кожице генотипа Чудное не регистрировали изменений в содержании АК в ответ на добавление всех метаболитов-предшественников. В мякоти положительный отклик отмечали при ее совместной инкубации с глюкозой, галактозой и миоинозитолом.

В тканях генотипа Раннее Болоньева регистрировали увеличение содержания АК в ответ на добавление только одного из метаболитов-предшественников: в кожице — этим предшественником была глюкоза, в мякоти — галактоза.

На 2-м этапе развития плодов в **2022** году ткани генотипа *M. baccata* в ответ на добавление в среду инкубации метаболитов-предшественников демонстрировали уменьшение АК (Табл. 7). В кожице *M. baccata* уменьшение содержания АК наблюдали в ответ на добавление глюкозы, гулоно-1,4-

лактона, галактозы и миоинозитола. В мякоти отрицательный отклик регистрировали в ответ на добавление гулоно-1,4-ктона в среду инкубации.

Ткани генотипа Добрыня на этом этапе развития плодов не демонстрировали откликов на добавление всех используемых метаболитов-предшественников как к коже, так и к мякоти.

В коже генотипа Пальметта регистрировали снижение содержания АК в ответ на добавление глюкозы, гулоно-1,4-лактона и миоинозитола. На остальные метаболиты-предшественники реакции не наблюдалось. В коже генотипов Чудное и Раннее Болоняева не регистрировали реакции в ответ на добавление всех метаболитов-предшественников. Однако в мякоти генотипа Чудное регистрировали увеличение содержания АК в ответ на добавление миоинозитола и уменьшение в ответ на добавление глюкозы, галактозы, глюкуроновой и галактуроновой кислот в среду инкубации. В мякоти генотипа Раннее Болоняева наблюдали положительный отклик в ответ на добавление к гулоно-1,4-лактона и галактозы. Отрицательных откликов на добавление тех или иных метаболитов-предшественников было значительно больше, чем положительных или отсутствия реакции.

На этапе зрелости в **2020** году при добавлении к коже *M. baccata* в среду инкубации галактозы регистрировали отрицательный отклик, при добавлении галактуроновой кислоты — положительный. В мякоти реакции на добавление метаболитов-предшественников не наблюдали (Табл. 8).

Добавление к мякоти генотипа Добрыня в среду инкубации глюкозы, гулоно-1,4-лактона, миоинозитола, глюкуроновой кислоты и галактоно-1,4-лактона вызывало достоверное увеличение содержания АК. При совместной инкубации кожицы этого генотипа с глюкозой содержание АК уменьшалось.

В тканях генотипа Ранетка пурпуровая наблюдали положительный отклик на инкубацию кожицы с такими метаболитами-предшественниками как: глюкоза, гулоно-1,4-лактон, галактоза, миоинозитол, глюкуроновая кислота, галактоно-1,4-лактон. В мякоти увеличение содержания АК

наблюдали только при добавлении в среду инкубации галактозы и глюкуроновой кислоты.

В коже генотипа Пальметта при добавлении галактозы уровень содержания АК увеличивался, а при добавлении глюкуроновой и галактуроновой кислот — уменьшался. В мякоти реакции на добавление метаболитов-предшественников не регистрировали.

В коже генотипа Чудное инкубация с гулоно-1,4-лактоном, галактозой, глюкуроновой кислоты и галактоно-1,4-лактоном приводила к увеличению содержания АК. В мякоти этого генотипа при добавлении глюкозы, гулоно-1,4-лактона и галактуроновой кислоты содержание АК снижалось.

В коже генотипа Раннее Болоньева положительный отклик наблюдали в ответ на добавление глюкозы, в мякоти — на добавление глюкозы, галактозы, галактоно-1,4- лактона.

На этапе зрелости в **2021** кожа *M. baccata* не реагировала на добавление метаболитов-предшественников. Мякоть этого генотипа при добавлении миоинозитола в среду инкубации демонстрировала уменьшение уровня содержания АК (Табл. 9).

В коже генотипа Добрыня не наблюдали ответа на добавление метаболитов-предшественников. В мякоти регистрировали положительный отклик на гулоно-1,4-лактон, миоинозитол, глюкуроновую кислоту, галактоно-1,4-лактон.

В коже генотипа Ранетка пурпуровая не наблюдали отклика на добавление метаболитов-предшественников. В мякоти наблюдали положительный отклик на добавление глюкуроновой кислоты.

В коже генотипа Пальметты регистрировали положительный отклик в ответ на добавление в среду инкубации следующих метаболитов-предшественников: глюкозы, гулоно-1,4-лактона, галактозы, миоинозитола, глюкуроновой кислоты и галактоно-1,4-лактона. В мякоти увеличивалось

содержание АК в ответ на добавление гулоно-1,4-лактона и глюкуроновой кислоты.

В коже генотипа Чудное наблюдали увеличение содержания АК в ответ на добавление глюкозы, а в мякоти положительный отклик наблюдали при добавлении глюкозы, гулоно-1,4-лактона, галактозы, миоинозитола.

В коже генотипа Раннее Болоняева наблюдали накопление АК при добавлении в среду инкубации глюкозы, глюкуроновой кислоты, галактурановой кислоты и галактоно-1,4-лактона. В мякоти реакции на метаболитов-предшественников не регистрировали.

На этапе зрелости в 2022 году в коже *M. baccata* увеличивалось содержание АК в ответ на добавление гулоно-1,4-лактона, галактозы и галактурановой кислоты. В мякоти этого генотипа наблюдали положительный отклик на добавление галактурановой кислоты и галактоно-1,4-лактона в среду инкубации (Табл. 10).

В тканях генотипа Добрыня не наблюдали реакции на добавление всех используемых метаболитов-предшественников.

В коже генотипа Пальметта наблюдали увеличение содержания АК при добавлении в среду инкубации глюкозы, галактозы и галактурановой кислоты. В мякоти не регистрировали отклика на добавление всех метаболитов-предшественников.

В коже генотипа Чудное наблюдали отрицательный отклик на добавление всех метаболитов-предшественников. В мякоти уменьшение содержания АК происходило в ответ на добавление и на добавление гулоно-1,4-лактона, галактозы, миоинозитола, глюкуроновой и галактурановых кислот.

В коже генотипа Раннее Болоняева не наблюдали реакции на добавление всех метаболитов-предшественников. В мякоти этого генотипа наблюдали отрицательный отклик в ответ на добавление глюкозы и галактозы.

В результате эксперимента с инкубацией тканей плодов с метаболитами-предшественниками синтеза АК было установлено, что основным путем

синтеза АК в тканях *M. baccata*, её гибридов F1 и сортов *M. domestica* являлся путь Смирнова-Уилера. Доказательством этого свидетельствовала ответная реакция по увеличению содержания АК в ответ на добавление в среду инкубации глюкозы, галактоно-1,4-лактона, галактозы, а также наличие относительно высокой экспрессии генов *GGP*.

Кроме этого показано, что в исследованных генотипах на разных этапах развития плода возможно функционирование также галактуринового и миоинозитолового пути синтеза АК. Эти пути более характерны для тканей кожицы, но в ряде случаев работают и в мякоти. Вероятно, эти пути биосинтеза могут обеспечивать накопление высокого содержания АК в *M. baccata* и ее высоковитаминных гибридов F1 (Добрыня и Ранетка пурпуровая).

По-видимому, в природных условиях ткани мякоти и кожицы некоторых генотипов имеют трудности с конвертацией предшественников синтеза АК. Так, например, в модельном эксперименте, в условиях избытка предшественников, в кожице генотипов Чудное и Раннее Болоньева на этапе зрелости плодов содержание АК увеличивалось в несколько раз за сутки по сравнению не только с контролем (добавление сахарозы), но и с содержанием АК в кожице плодов этих сортов *in vivo*. Такое значительное увеличение содержания АК было характерно не только для последней реакции миоинозитолового пути, но и при добавлении глюкуроновой кислоты. В результате содержание АК в инкубированных тканях плодов могло в несколько раз превышает таковое в кожице плодов этого сорта *in vivo*.

На этапе зрелости в плодах *M. baccata* накапливалось достаточное содержание предшественников синтеза АК. Это, в совокупности с повышенной экспрессией генов *GGP1*, *GGP3*, вероятно, позволяло успешно синтезировать высокий уровень содержания АК. Поддержание такого уровня обеспечивалось повышенной экспрессией *MDHAR1* и высокой активностью фермента МДГАР.

В тканях плодов высоковитаминных гибридов F1 (Добрыня и Ранетка пурпуровая) синтезировалось примерно в 5 раз меньше АК в сравнении с *M. baccata*, несмотря хорошую обеспеченность субстратами для его синтеза.

Низкий уровень АК в тканях генотипов Пальметта, Чудное, Раннее Болоняева, вероятно, может быть связан с наличием факторов, подавляющих синтез АК на каком-то из его этапов.

В разные годы эксперимента была выявлена не только положительная, но и отрицательная реакция на добавление метаболитов-предшественников в среду инкубации, которая приводила к достоверному снижению содержания АК в тканях. Этот факт может свидетельствовать в пользу существования динамического лимита содержания АК в тканях, вероятно, зависящего от факторов внешней среды, таких как, например, ночные температуры и освещённость. Кроме того, это может свидетельствовать об активации иных процессов, требующих тех же субстратов, что и синтез АК, что приводит к их «утечке».

Обобщая вышесказанное, логично предположить, что при инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками синтеза АК основным путем биосинтеза АК в изученных генотипах являлся путь Смирнова-Уилера. При инкубации также отмечался отклик на 1,4-гулонолактон, миоинозитол, галактурановую кислоту, что можно рассматривать как возможность синтеза АК по миоинозитольному и галактурановому пути.

Таблица 5. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на 2-м этапе развития плодов в 2020 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4- лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуроно-1,4- кислота	Галактоно-1,4- лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	2,874±0,310	2,777±0,277	2,639±0,048	2,653±0,200	2,772±0,334	3,2389±0,257* ↑ 25%	2,909±0,270	2,599±0,294
<i>M. baccata</i> М	1,185±0,383	1,192±0,156	1,433±0,219* ↑ 46%	0,950±0,169	0,886±0,126	1,080±0,395	1,326±0,148* ↑ 35%	0,984±0,168
Добрыня К	1,470±0,104* ↑ 31%	1,469±0,066* ↑ 31%	1,333±0,066* ↑ 18%	1,341±0,133	1,125±0,053	1,249±0,067	1,283±0,155	1,125±0,049
Добрыня М	0,247±0,023* ↓ -28%	0,277±0,008* ↓ -20%	0,340±0,043	0,310±0,022	0,283±0,031	0,301±0,035	0,340±0,030	0,345±0,037
Пальметта К	0,029±0,009	0,136±0,047* ↑ 147%	0,172±0,024* ↑ 213%	0,127±0,017* ↑ 131%	0,056±0,013	0,036±0,031	0,149±0,034* ↑ 171%	0,055±0,036
Пальметта М	0,028±0,005	0,009±0,005	0,057±0,009* ↑ 104%*	0,042±0,016	0,040±0,007	0,008±0,002	0,051±0,018	0,028±0,015
Ранетка пурпуровая К	1,509±0,190* ↑ 73%	1,147±0,081* ↑ 32%	1,326±0,132* ↑ 52%	1,021±0,155	0,942±0,167	0,719±0,189	0,934±0,056	0,870±0,142
Ранетка пурпуровая М	0,370±0,013	0,390±0,118	0,373±0,020	0,312±0,100	0,391±0,036	0,431±0,075	0,412±0,039	0,341±0,071
Чудное К	0,035±0,011* ↓ -55%	0,041±0,007* ↓ -47%	0,054±0,007* ↓ -30%	0,035±0,011* ↓ -55%	0,032±0,005* ↓ -58%	0,175±0,053* ↑ 127%	0,107±0,028	0,077±0,007
Чудное М	0,014±0,003	0,008±0,003	0,005±0,000	0,007±0,001	0,012±0,001	0,062±0,017	0,015±0,007	0,012±0,002
Раннее Болоняева К	0,134±0,042	0,196±0,041	0,233±0,056	0,086±0,033	0,061±0,007* ↓ -65%	0,062±0,016	0,088±0,025	0,174±0,092
Раннее Болоняева М	0,013±0,003* ↑ 160%	0,005±0,001	0,007±0,001	0,016±0,007* ↑ 220%	0,008±0,004	0,008±0,003	0,005±0,001	0,005±0,001

Примечание: К-кожица, М-мякоть, *— $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержания АК относительно контроля, **синним** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

Таблица 6. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на 2-м этапе развития плодов в 2021 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4- лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуроно- вая кислота	Галактоно-1,4- лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	4,323±0,158** ↑ 26%	4,275±0,307* ↑ 24%	3,489±0,655	3,787±0,650	3,746±0,260	3,500±0,108	3,793±0,508	3,435±0,182
<i>M. baccata</i> М	2,287±0,470	2,025±0,134	1,974±0,262	1,895±0,216	1,919±0,023	2,201±0,208	2,215±0,236	1,925±0,120
Добрыня К	0,866±0,145	0,854±0,067	1,057±0,094* ↑ 39%	0,868±0,120	0,897±0,113	0,793±0,021	1,005±0,386	0,763±0,053
Добрыня	0,309±0,068	0,306±0,025* ↑ 46%	0,311±0,036* ↑ 48%	0,292±0,007	0,385±0,067** ↑ 83%	0,259±0,041	0,312±0,086	0,210±0,029
Пальметта К	0,042±0,015	0,062±0,012	0,054±0,011	0,089±0,021* ↑ 134%	0,042±0,014	0,062±0,009* ↑ 63%	0,074±0,019* ↑ 95%	0,038±0,008
Пальметта М	0,028±0,002	0,027±0,009	0,020±0,021	0,032±0,011	0,038±0,019	0,015±0,003	0,019±0,008	0,021±0,005
Ранетка пурпуровая К	0,935±0,076** ↑ 18%	0,888±0,104	0,850±0,035	0,928±0,224	0,732±0,055	1,030±0,128** ↑ 30%	0,958±0,041** ↑ 21%	0,794±0,041
Ранетка пурпуровая М	0,413±0,030	0,379±0,060	0,423±0,057	0,342±0,024	0,283±0,021	0,380±0,004	0,429±0,015	0,405±0,017
Чудное К	0,031±0,013	0,019±0,008	0,010±0,004	0,048±0,043	0,027±0,029	0,015±0,008	0,018±0,007	0,017±0,007
Чудное М	0,063±0,010*** ↑ 688%	0,035±0,026	0,046±0,008*** ↑ 485%	0,038±0,014* ↑ 375%	0,022±0,015	0,029±0,010	0,011±0,008	0,008±0,002
Раннее Болоняева К	0,063±0,010*** ↑ 320%	0,017±0,003	0,044±0,032	0,096±0,010	0,041±0,014	0,006±0,002	0,02±0,001	0,015±0,012
Раннее Болоняева М	0,009±0,004	0,003±0,001	0,011±0,007*** ↑ 267%	0,009±0,006	0,002±0,001	0,001±0,001	0,001±0,000	0,003±0,001

Примечание: К-кожица, М-мякоть, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержание АК относительно контроля, **синим** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

Таблица 7. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на 2-м этапе развития плодов в 2022 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4- лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуроновая кислота	Галактоно- 1,4-лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	3,148±0,079** ↓ -26%	2,511±0,221*** ↓ -41%	2,883±0,300** ↓ -32%	2,691±0,083*** ↓ -36%	3,955±0,058	4,079±0,160	4,594±1,852	4,234±0,233
<i>M. baccata</i> М	2,237±0,082	2,167±0,231	2,294±0,128	2,403±0,362	2,472±0,289	2,174±0,060	2,091±0,061	2,216±0,284
Добрыня К	1,202±0,098	1,055±0,036	1,107±0,117	1,165±0,041	1,169±0,087	1,041±0,052	1,121±0,087	1,124±0,087
Добрыня М	0,852±0,056	0,771±0,086	0,777±0,037	0,881±0,033	0,821±0,167	0,766±0,050	0,866±0,472	0,727±0,162
Пальметта К	0,106±0,012	0,040±0,027* ↓ -63%	0,021±0,030* ↓ -80%	0,046±0,106** ↓ -57%	0,075±0,029	0,083±0,003	0,123±0,023	0,107±0,020
Пальметта М	0,059±0,028	0,023±0,014* ↓ -74%	0,005±0,001** ↓ -94%	0,058±0,004	0,065±0,025	0,064±0,031	0,036±0,005* ↓ -60%	0,089±0,027
Ранетка пурпуровая К	—	—	—	—	—	—	—	—
Ранетка пурпуровая М	—	—	—	—	—	—	—	—
Чудное К	0,238±0,010	0,141±0,086	0,216±0,065	0,089±0,016	0,147±0,062	0,220±0,044	0,281±0,048	0,237±0,097
Чудное М	0,048±0,007* ↓ -41%	0,015±0,024	0,037±0,014** ↓ -54%	0,121±0,004*** ↑ 49%	0,033±0,005*** ↓ -59%	0,067±0,012** ↓ -17%	0,121±0,015	0,081±0,004
Раннее Болоняева К	0,094±0,018	0,166±0,022	0,244±0,025	0,134±0,067	0,262±0,039	0,194±0,029	0,090±0,008	0,046±0,027
Раннее Болоняева М	0,013±0,011	0,041±0,001*** ↑ 1950%	0,013±0,003** ↑ 550%	0,018±0,020	0,049±0,019	0,010±0,011	0,020±0,007	0,002±0,000

Примечание: К-кожица, М-мякоть, *— $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержание АК относительно контроля, **синим** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

Таблица 8. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на этапе зрелости плодов в 2020 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4-лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуроно-вая кислота	Галактоно-1,4-лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	0,859±0,154	0,906±0,206	0,252±0,053* ↓ -67%	0,856±0,161	0,777±0,113	1,675±0,448* ↑ 116%	0,554±0,124	0,774±0,259
<i>M. baccata</i> М	0,320±0,050	0,348±0,050	0,240±0,031	0,272±0,041	0,398±0,169	0,309±0,079	0,336±0,285	0,273±0,090
Добрыня К	0,823±0,059* ↑ 45%	0,635±0,124	0,756±0,213	0,537±0,048	0,596±0,171	0,461±0,085	0,430±0,108	0,567±0,151
Добрыня М	0,151±0,022* ↑ 74%	0,134±0,016* ↑ 54%	0,107±0,040	0,171±0,029* ↑ 97%	0,202±0,018* ↑ 132%	0,077±0,006	0,110±0,013* ↑ 26%	0,087±0,006
Пальметта К	0,198±0,026	0,282±0,095	0,315±0,045* ↑ 114%	0,214±0,040	0,034±0,013* ↓ -77%	0,036±0,031* ↓ -76%	0,135±0,065	0,147±0,031
Пальметта М	0,112±0,016	0,077±0,015	0,076±0,016	0,100±0,023	0,128±0,013	0,058±0,012	0,100±0,031	0,092±0,018
Ранетка пурпуровая К	0,695±0,165* ↑ 44%	0,745±0,186* ↑ 55%	0,773±0,225* ↑ 60%	0,689±0,077* ↑ 43%	0,917±0,115* ↑ 90%	0,453±0,044	0,616±0,055* ↑ 26%	0,482±0,054
Ранетка пурпуровая М	0,203±0,073	0,151±0,015	0,200±0,020* ↑ 32%	0,154±0,017	0,219±0,031* ↑ 45%	0,165±0,018	0,129±0,017	0,151±0,015
Чудное К	0,008±0,002	0,170±0,071* ↑ 2329%	0,032±0,020* ↑ 357%	0,060±0,060	0,137±0,091* ↑ 1857%	0,008±0,001	0,027±0,010* ↑ 286%*	0,007±0,002
Чудное М	0,012±0,003* ↓ -56%	0,007±0,003* ↓ -74%	0,015±0,003	0,014±0,007	0,023±0,013	0,012±0,014	0,014±0,009	0,027±0,009
Раннее Болоняева К	0,162±0,044* ↑ 1700%	0,028±0,004	0,064±0,045	0,039±0,023	0,046±0,005	0,049±0,016	0,014±0,007	0,009±0,006
Раннее Болоняева М	0,024±0,016* ↑ 500%	0,007±0,003	0,016±0,003* ↑ 300%	0,007±0,004	0,012±0,005	0,010±0,006	0,011±0,004* ↑ 175%	0,004±0,001

Примечание: К-кожица, М-мякоть, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержание АК относительно контроля, **синим** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

Таблица 9. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на этапе зрелости плодов в 2021 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4-лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуриновая кислота	Галактоно-1,4-лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	0,894±0,093	0,941±0,102	0,917±0,057	0,856±0,226	0,829±0,050	0,914±0,147	0,991±0,009	0,897±0,217
<i>M. baccata</i> М	0,382±0,034	0,367±0,048	0,364±0,030	0,312±0,039** ↓ -15%	0,417±0,015	0,356±0,020	0,426±0,015	0,431±0,043
Добрыня К	0,535±0,056	0,599±0,048	0,757±0,079	0,494±0,078	0,400±0,151	0,377±0,094	0,627±0,070	0,541±0,154
Добрыня М	0,193±0,037	0,204±0,006* ↑ 33%	0,188±0,039	0,241±0,027* ↑ 58%	0,233±0,016** ↑ 52%	0,150±0,014	0,231±0,023** ↑ 51%	0,153±0,012
Пальметта К	0,111±0,044* ↑ 327%	0,074±0,022* ↑ 185%	0,113±0,044* ↑ 335%	0,079±0,040** ↑ 204%	0,098±0,020** ↑ 277%	0,037±0,043	0,054±0,014* ↑ 108%	0,026±0,019
Пальметта М	0,028±0,015	0,071±0,018** ↑ 492%	0,049±0,048	0,026±0,010	0,070±0,025* ↑ 483%	0,012±0,010	0,041±0,029	0,012±0,008
Ранетка пурпуровая К	1,143±0,157	1,089±0,067	1,179±0,064	0,762±0,418	1,158±0,121	1,033±0,135	0,956±0,134	0,948±0,310
Ранетка пурпуровая М	0,386±0,036	0,338±0,043	0,386±0,035	0,446±0,038	0,424±0,006* ↑ 12%	0,412±0,037	0,390±0,063	0,378±0,022
Чудное К	0,244±0,065* ↑ 112%	0,187±0,031	0,154±0,097	0,163±0,064	0,169±0,086	0,174±0,025	0,099±0,112	0,115±0,037
Чудное М	0,113±0,036* ↑ 157%	0,110±0,011*** ↑ 150%	0,114±0,019** ↑ 159%	0,128±0,022** ↑ 191%	0,110±0,014	0,050±0,031	0,044±0,018	0,044±0,004
Раннее Болоняева К	0,149±0,046* ↑ 521%	0,042±0,023	0,031±0,015	0,028±0,020	0,078±0,019* ↑ 225%	0,061±0,013* ↑ 154%	0,057±0,008* ↑ 138%	0,024±0,016
Раннее Болоняева М	0,023±0,011	0,041±0,021	0,054±0,009	0,034±0,022	0,015±0,005	0,008±0,002	0,020±0,010	0,027±0,007

Примечание: К-кожица, М-мякоть, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержание АК относительно контроля, **синим** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

Таблица 10. Содержание АК в тканях плодов после добавления метаболитов-предшественников синтеза АК в среду инкубации на этапе зрелости плодов в 2022 г.

	Глюкоза	Гулоно-1,4-лактон	L-галактоза	Миоинозитол	Глюкуроновая кислота	Галактуроно-вая кислота	Галактоно-1,4-лактон	Сахароза (контроль)
<i>M. baccata</i> К	0,53±0,20	0,42± 0,05* ↑ 31%	0,42± 0,03** ↑ 31%	0,35± 0,02	0,32±0,08	0,46± 0,073* ↑ 44%	0,25± 0,02	0,32± 0,01
<i>M. baccata</i> М	0,16± 0,03	0,18± 0,04	0,20± 0,019* ↑ 33%	0,19± 0,10	0,17± 0,05	0,17± 0,01	0,31±0,02* ↑ 107%	0,15± 0,01
Добрыня К	0,368±0,032	0,385±0,070	0,413±0,058	0,391±0,037	0,386±0,055	0,458±0,033	0,291±0,021	0,418±0,080
Добрыня М	0,153±0,039	0,145±0,019	0,140±0,013	0,195±0,001	0,183±0,009	0,171±0,040	0,194±0,067	0,182±0,013
Пальметта К	0,591±0,067** ↑ 60%	0,438±0,066	0,703±0,067** ↑ 90%	0,568±0,121	0,432±0,063* ↑ 17%	0,682±0,007*** ↑ 84%	0,629±0,087* ↑ 70%	0,370±0,045
Пальметта М	0,173±0,021	0,263±0,015	0,281±0,015	0,220±0,050	0,221±0,011	0,267±0,030	0,115±0,011	0,164±0,011
Ранетка пурпуровая К	—	—	—	—	—	—	—	—
Ранетка пурпуровая М	—	—	—	—	—	—	—	—
Чудное К	0,290±0,134** ↓ -34%	0,081±0,014*** ↓ -82%	0,173±0,021** ↓ -61%	0,022±0,003** ↓ -95%	0,326±0,050* ↓ -26%	0,160±0,019** ↓ -64%	0,211±0,075** ↓ -52%	0,442±0,158
Чудное М	0,055±0,006	0,018±0,012* ↓ -80%	0,012±0,001** ↓ -86%	0,018±0,002** ↓ -80%	0,008±0,003*** ↓ -91%	0,047±0,007* ↓ -47%	0,108±0,020	0,088±0,021
Раннее Болоняева К	0,051±0,010* ↓ -71%	0,040±0,005	0,229±0,055* ↑ 32%	0,082±0,015	0,111±0,034	0,076±0,034	0,123±0,011	0,173±0,032
Раннее Болоняева М	0,027±0,013	0,033±0,017	0,036±0,005	0,018±0,011	0,031±0,015	0,041±0,004	0,041±0,007	0,034±0,004

Примечание: К-кожица, М-мякоть, *— $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **красным** отмечено повышение содержание АК относительно контроля, **синним** отмечено снижение содержания АК относительно контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время одной из приоритетных задач селекции яблони является выведение сортов, обладающих улучшенными агробиологическими характеристиками, в том числе повышенным содержанием АК и других биологически активных веществ в плодах (Седов, 2015). Решение этой задачи требует максимально подробной информации о метаболических процессах, происходящих в плодах на разных стадиях развития, а также анализа взаимосвязей между ними. Данные о биохимическом составе, генетических и метаболических особенностях плодов диких видов, включая плоды *M. baccata*, фрагментарны и разрознены.

Существует большое количество гибридных сортов (F1, F2, F3 и т.д.) *M. baccata* с *M. domestica*. Несмотря на то, что такие растения широко распространены в Сибири, биохимический состав их плодов и особенности метаболизма АК также остаются малоизученными.

Известно о существовании не менее четырех путей биосинтеза АК в тканях плодов фруктовых деревьев (Smirnoff, 2018). Содержание АК в плодах значительно варьирует в зависимости от исследуемого сорта и вида (Scalzo et al., 2005). Однако ткани плодов *M. domestica* не отличаются высоким содержанием АК — в среднем этот параметр составляет около 0,04 мг/г сырого веса. (Bianchi et al., 2020).

Стратегия накопления АК в плодах *M. domestica* следующая: на 1-м этапе развития плода накапливается некоторое количество АК, преимущественно в кожице, достаточное для эффективной борьбы с оксидативным стрессом. При дальнейшем росте и развитии плода содержание АК снижается, и это снижение продолжается до стадии биологической зрелости плодов (Fang et al., 2017; Li et al., 2008). Возможно, что низкое содержание АК у *M. domestica* связано с длительным отбором в пользу сладкого вкуса плодов. В работе Т. Fang с соавторами (Fang et al., 2017) были показаны существенные различия в содержании АК в исследуемой выборке яблонь. Наиболее высокие значения, до 0,28 мг/г сырого веса, были отмечены преимущественно у диких видов. Еще

более высокое содержание АК, более 1,2 мг/г сырого веса, наблюдали в тканях плодов диких видов, характерных для территории Восточной Сибири и Дальнего Востока (Stavitskaya et al., 2023).

В отличие от *M. domestica*, плоды *M. baccata* и её гибридов демонстрировали иную стратегию накопления АК. *M. baccata* уже на раннем этапе развития плодов отличалась высоким содержанием АК и в коже, и в мякоти. Содержание АК во всех тканях увеличивалось на 2-м этапе развития, и продолжало повышаться к стадии зрелости. В тканях плодов гибридов F1 содержание АК снижалось примерно в 5 раз в сравнении с *M. baccata*, однако всё еще было выше, чем в тканях плодов *M. domestica*. У генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая содержание АК в мякоти не подвергалось изменению после 2-го этапа развития плодов. Генотипы с низким содержанием АК на 1-м этапе развития, такие как Пальметта, Чудное и Раннее Болоньева не имели тенденции к заметному увеличению АК к зрелости.

Разные стратегии накопления АК в тканях плодов генотипов яблони обеспечиваются задействованием различных путей синтеза АК на разных стадиях вегетации. Для *M. domestica* основным путем является путь Смирнова-Уилера (Li et al., 2011). Наличие дополнительных путей синтеза в тканях плодов яблони и их интенсивность работы являются видо- и сортоспецифичными. Как известно, галактуроновый путь синтеза АК или путь «подхвата» пектина не является основным путем синтеза АК у *M. domestica*. (Li et al., 2011). Современные исследования позволяют сделать предположение, что активация этого пути в плодах яблони происходит под влиянием стрессовых условий и позволяет быстро нарастить пул АК, так как галактуроновый путь значительно короче, чем путь Смирнова-Уилера. Процесс «подхвата» пектина может реализоваться в зрелых плодах, при естественном размягчении клеточных стенок и высвобождения пектинов. Однако, высокое содержание АК в клетке, полученное как в результате высокого уровня экспрессии генов АК или активности системы рециркуляции, так и в результате первичного ответа на оксидативный стресс, может запустить

процесс неферментативного расщепления пектина клеточных стенок и в тканях незрелых плодов, высвобождая галактуроновую кислоту для поддержания пула АК на необходимом высоком уровне содержания до конца стрессового воздействия.

Важнейшей регуляторной точкой в пути Смирнова-Уилера является превращение ГДФ-L-галактозы в L-галактозо-1-фосфат, контролируемое генами ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*GGP*) и активностью соответствующего фермента. В тканях плодов *M. baccata* наблюдалось достоверное увеличение относительной экспрессии *GGP1* на этапе зрелости плодов. В тканях генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая наблюдали уменьшение экспрессии *GGP1* к зрелости. В отличие от *GGP1*, относительная экспрессия *GGP3* значительно увеличивалась в тканях плодов всех генотипов к стадии зрелости. Можно предположить, что значительное увеличение экспрессии гена *GGP1* может являться показателем, ассоциированным с накоплением высокого уровня АК и указывающим на существование динамического лимита накопления АК.

Важную роль в поддержании оптимального уровня содержания АК играет процесс её рециркуляции. Гены *DHAR3* и *MDHAR1* и соответствующие им ферменты рециркуляции играют ключевую роль в этом процессе (Suekawa et al., 2018). Эти ферменты участвуют в восстановлении окисленных форм АК, обеспечивая оптимальный уровень антиоксидантной защиты в растительных тканях. В плодах *M. domestica* доминирующую роль в поддержании процесса рециркуляции АК играют гены *DHAR* (Li et al., 2011).

В плодах *M. baccata* активность ферментов и экспрессия генов, участвующих в рециркуляции АК, отличалась от таковой у *M. domestica*. Наше исследование показало, что у *M. baccata* экспрессия гена *MDHAR1* значительно увеличивалась на этапе зрелости плодов, превышая уровень экспрессии этого гена у других генотипов как в кожице, так и в мякоти. Это может быть одной из причин более высокого содержания АК в плодах *M. baccata*.

На разных этапах развития плодов ферменты МДГАР и ДГАР функционировали по-разному, дополняя друг друга для поддержания оптимального содержания АК в тканях. Такая координация работы ферментов создает эффект «качелей», обеспечивая стабильное функционирование системы рециркуляции АК.

Фермент аскорбатпероксидаза проявлял высокую активность у всех исследуемых генотипов. Активность МДГАР была меньше, чем активность АПО. Самую низкую активность наблюдали у фермента ДГАР. Пропорция их активности составляла 1: 3: 5 (ДГАР: МДГАР: АПО), что подчеркивает важность участия МДГАР и АПО в метаболизме АК в тканях плодов исследованных генотипов.

Для обеспечения непрерывности процессов биосинтеза АК в тканях плодов требуется наличие достаточного уровня предшественников, таких как сорбитол, сахароза, фруктоза, глюкоза. Их накопление важно и для формирования качества и вкусовых характеристик плодов. В процессе роста и развития плодов происходит изменение соотношения и содержания различных сахаров в тканях. На 2-м этапе развития в плодах наблюдали преобладание транспортных форм сахаров — сахарозы и сорбитола, к зрелости доминирующими формами становились фруктоза и глюкоза (Tijero et al., 2021). Накопление и соотношение содержаний растворимых сахаров напрямую влияет и на многие другие метаболические процессы (Taо et al., 2020).

В тканях плодов исследованных генотипов были обнаружены закономерности накопления растворимых углеводов. В тканях *M. baccata* уже на 1-м этапе развития плодов наблюдали высокое содержание сорбитола, которое было максимальным среди тканей исследованных генотипов. Даже на этапе зрелости в тканях плодов *M. baccata* наблюдалось очень высокое его содержание. В тканях плодов генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая содержание сорбитола было ниже, чем в тканях плодов *M. baccata*. В генотипах Пальметта, Чудное и Раннее Болоньева содержание сорбитола к зрелости

уменьшалось и было минимальным в сравнении с остальными исследованными генотипами.

Вероятно, высокое содержание сорбитола является видоспецифическим признаком *M. baccata* и частично наследуется ее гибридами F1.

Содержание глюкозы, фруктозы, сорбита, сахарозы в генотипах Пальметта, Чудное, Раннее Болоняева было достаточным для накопления высокого уровня АК. Однако этого не наблюдалось, что может свидетельствовать о наличии динамического лимита накопления АК и/или регуляции биосинтеза АК другими путями.

Пектины играют ключевую роль в формировании текстуры плодов яблони. Уровень содержания пектинов в яблоках значительно варьируется, что обусловлено сортовыми характеристиками, агротехническими условиями выращивания и степенью зрелости плодов. В среднем, содержание пектинов в плодах *M. domestica* варьирует от 0,5% до 3% от общего веса плода (Sozaeva et al., 2016). В тканях плодов *M. baccata* отмечалось наибольшее содержание суммарных пектиновых веществ, более 0,25 мг/г сырого веса (2,5 % от веса плода). Содержание протопектина в тканях всех исследуемых генотипов было выше, чем содержание водорастворимого пектина. Такое соотношение пектиновых фракций, по-видимому, объясняется коротким вегетационным периодом региона репродукции. Пектиновые фракции всех генотипов отличались этерификацией выше 50%.

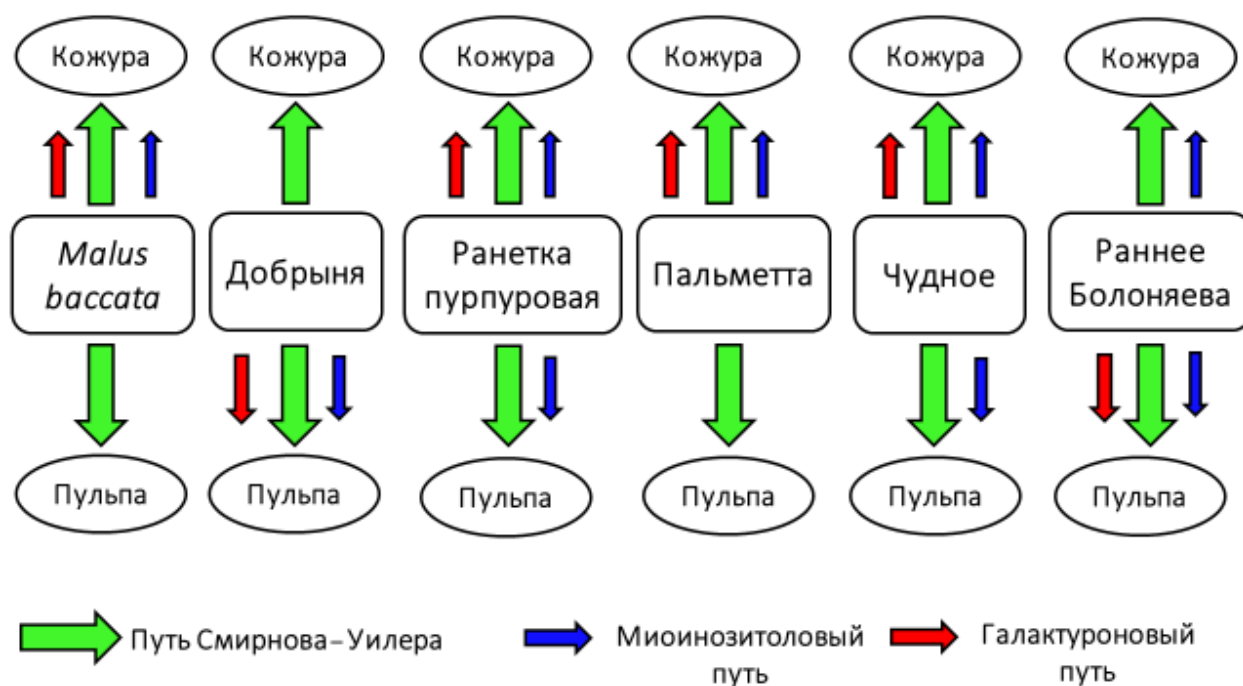


Рисунок 35. Схема путей биосинтеза АК в тканях плодов *M. baccata*, гибридов F1, *M. domestica*. по результатам модельного эксперимента.

Согласно полученным данным, основным путем синтеза АК у в тканях *M. baccata*, ее гибридов и сортов *M. domestica* являлся путь Смирнова-Уилера. На разных стадиях созревания плодов отмечали возможность функционирования также D-галактуронового и миоинозитолового пути синтеза АК (рис. 35).

Эти пути характерны для тканей кожицы, но в ряде случаев работали и в мякоти. Анализ результатов показал, что функционирование дополнительных путей биосинтеза АК возможно уже на 20-й день после образования завязи, что подтверждалось наличием отклика в модельном эксперименте на соответствующие метаболиты-предшественники синтеза АК в тканях *M. baccata*, генотипов Добрыня и Ранетка пурпуровая. Однако в генотипах Пальметта, Чудное и Раннее Болоняева, несмотря на доказанную возможность функционирования дополнительных путей, содержание АК оставалось низким.

Максимум накопления АК в модельном эксперименте с добавлением метаболитов-предшественников биосинтеза АК в тканях плодов *M. baccata* и

ее высоковитаминных гибридов фиксировали на 2-м этапе развития плодов, в то время как в тканях плодов, не участвовавших в эксперименте, максимум накопления наблюдали на стадии зрелости. Это указывает на важную роль системы рециркуляции в поддержании уровня АК в тканях плодов.

В некоторых случаях добавление метаболитов-предшественников приводило к достоверному снижению содержания АК в тканях, что свидетельствует в пользу существования динамического лимита содержания АК в тканях, зависящего от факторов внешней среды, таких как ночные температуры и освещённость. Кроме того, это может свидетельствовать об активации иных процессов, требующих тех же углеводов, что и синтез АК, что приводит к «утечке» субстратов.



Рисунок 36. Итоговая схема особенностей биосинтеза, накопления и рециркуляции АК в тканях *M. baccata* на разных этапах развития плодов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для тканей плодов *M. baccata* характерна отличная от *M. domestica* стратегия накопления и поддержания уровня содержания АК в плодах (рис. 36).

Накопление высокого уровня содержания АК уже на 1-м этапе развития плодов стадии обусловлено активной экспрессией генов *GGP1*, *GGP3*. Повышенный уровень экспрессии *MDHAR1* и активности фермента МДГАР позволяет поддерживать высокое содержание АК на 2-м и 3-м этапах развития плодов. Такие особенности накопления АК, по-видимому, связаны с адаптацией к условиям окружающей среды и климатическим особенностям региона произрастания. Гибриды F1 частично наследуют механизмы поддержания высокого уровня АК.

Перспективы использования гена *MDHAR1* в селекции яблони могут быть связаны с созданием маркера, который позволит отбирать генотипы с повышенной экспрессией этого гена уже на ранней стадии развития. Это может ускорить процесс выведения новых сортов яблони с более высоким содержанием АК в плодах. Такие сорта могут иметь ряд преимуществ, включая улучшенные вкусовые и питательные свойства и устойчивость к стрессовым условиям.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наибольшее содержание АК среди всех изученных генотипов было в тканях *M. baccata* на всех стадиях развития плодов. Увеличение содержания АК в тканях *M. baccata* наблюдалось уже на ювенильной стадии развития плодов, в тканях гибридов F1 — на стадии активного роста.

2. Выявлено, что в тканях плодов *M. baccata* на стадии зрелости увеличивался уровень экспрессии как гена *GGP1*, так и *GGP3*. В тканях плодов гибридов F1 на стадии зрелости увеличивался уровень экспрессии только гена *GGP3*, а экспрессия *GGP1* снижалась.

3. В тканях плодов *M. baccata* уровень экспрессии *MDHAR1* многократно превышал уровень экспрессии *DHAR3*, сопровождался повышенной активностью фермента МДГАР и коррелировал с высоким содержанием АК.

4. В тканях плодов *M. baccata* и ее гибридов F1, в отличие от *M. domestica*, доминирующим ферментом в цикле рециркуляции являлась монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР). Высокая активность МДГАР на всех стадиях развития плодов во всех тканях *M. baccata* была сопряжена с повышенной экспрессией гена *MDHAR1* и коррелировала с высоким содержанием АК.

5. Установлено, что несмотря на достаточный уровень содержания предшественников АК на всех стадиях развития плодов, нормальную экспрессию генов *GGP1*, *GGP3*, *MDHAR1* и *DHAR3* и активность ферментов рециркуляции в тканях плодов *M. domestica* и генотипа Пальметта, накопление АК было минимальным.

6. Выявлено, что основным путём биосинтеза АК в тканях плодов изученных генотипов являлся путь Смирнова-Уилера. В тканях плодов *M. baccata* и её гибридов, помимо пути Смирнова-Уилера, были задействованы миоинозитоловый и галактуроновый пути синтеза АК. На стадии зрелости

большее значение для поддержания высокого уровня АК в тканях плодов приобретала активность системы рециркуляции.

7. *Malus baccata* имеет отличную от *M. domestica* стратегию накопления и поддержания высокого содержания АК в плодах. В плодах гибридов F1 наблюдалось снижение содержания АК. Тем не менее, уровень её содержания в плодах гибридов превышал аналогичный показатель в плодах *M. domestica*, при этом изменялась локализация дополнительных метаболических путей синтеза АК в тканях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко С.В. История развития садоводства в Омской области / С.В. Бондаренко, Д.С. Дисюк, Е.В. Пленкова, В.В. Лёушкина // Состояние и перспективы развития садоводства в Сибири. – 2016. – С. 123-125.
2. Васильева В.Н. Яблоня в Сибири: интродукция, селекция, сорта / В.Н. Васильева // Нск.: Наука– 1991. – 148с.
3. Госреестр, <https://gossortrf.ru/registry/>
4. Елисеева Т. Витамин С (аскорбиновая кислота) описание, польза и где содержится / Т. Елисеева, А. Мироненко // Журнал здорового питания и диетологии. – 2018. – Т. 2. – №. 4. – С. 33-44.
5. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош, Ю.В. Перуанский, Г.А. Луковникова, М.И. Иконникова // Л.: Агропромиздат. – 1987. – 456с.
6. Исачкин А.В. Сортовой каталог плодовых культур России / А.В. Исачкин, Б.Н. Воробьев // М: Астрель – 2003. – 573с.
7. Кичина В.В. Принципы улучшения садовых растений / В.В. Кичина // М: ВСТИСП. – 2011. – 528с.
8. Козловская З.А. Селекция яблони в Беларуси / З.А. Козловская // Минск: Беларуская навука. – 2015. – 457с.
9. Лангенфельд В.Т. Яблоня. Морфологическая эволюция, география, систематика / В.Т. Лангенфельд // Рига: Зинатне. – 1991. – 232с.
10. Макаренко С.А. Адаптивная селекция яблони в низкогорье Алтая: дис. — Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, 2017.
11. Макаренко С.А. Основы селекции яблони на юге западной Сибири / С.А. Макаренко // Инновационные направления развития сибирского садоводства: наследие академиков М. А. Лисавенко, И. П. Калининой. – 2018. – С. 167-173.
12. Макаренко С.А. Приоритетные направления селекции яблони для районов с суровыми климатическими условиями / С.А. Макаренко // Вестник

Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – №. 8 (178). – С. 28-35.

13. Матвеева Р.М., Всеволод Михайлович Крутовский – создатель ботанического сада / Р. М. Матвеева, О.Ф. Буторова, С.Г. Елисеев // Хвойные бореальной зоны. – 2025. – Т. 42. – №. 6. – С. 7-10.

14. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35. – №. 3. – С. 293-310.

15. Оводова Р.Г. Новейшие сведения о пектиновых полисахаридах / Р.Г. Оводова, В. В. Головченко, С. В. Попов, Ю. С. Оводов // Известия Коми научного центра УРО РАН. – 2010. – №. 3.

16. Опалко О.А. Яблоня (*Malus* Mill.) в истории и культуре украинского и других этносов / О.А. Опалко, А. В. Конопелько, А.И. Опалко // Сибирский лесной журнал. – 2019. – Т. 4. – С. 18-35.

17. Пономаренко В.В., Пономаренко К.В. Видовое разнообразие и селекционный потенциал рода MILL. / В.В. Пономаренко, К.В. Пономаренко // Садоводство и виноградарство. – 2013. – №. 1. – С. 19-23.

18. Савельева Е. Н. Изучение генетического разнообразия рода *Malus* Mill. (яблоня) с помощью ДНК-маркеров: дис. – автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2016.

19. Савинич Е.А. Из истории садоводства Красноярского края // Закон и общество: история, проблемы, перспективы: Материалы XIX межвузовской научно-практической конференции студентов, магистрантов и аспирантов (с международным участием). Красноярск. – 2016. – С. 255.

20. Седов Е.Н. (ред.) Помология. Яблоня. Том 1. Орел: ВНИИСПК. – 2020. – 633с.

21. Седов Е.Н. Программы, методы, приемы селекции яблони, их развитие и совершенствование / Е.Н. Седов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 3. – С. 487-498.

22. Седов Е.Н. Селекция яблони / Е.Н. Седов, И.П. Калинина, В.К. Смыков // Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – 1995. – С. 159-200.
23. Седов Е.Н. Сорты яблони народной селекции и их роль в совершенствовании сортимента / Е.Н. Седов, Н.Г. Красова, Т.В. Янчук, С.А. Корнеева, А.М. Галашева // Садоводство и виноградарство. – 2020. – Т. 2. – С. 14-20.
24. Ставицкая З.О. Сравнительный анализ состава и содержания углеводов в плодах *Malus baccata* (L.) Borkh. и её гибридных сортов с *Malus domestica* (Suckow) Borkh. / З.О. Ставицкая, Е.Г. Рудиковская, Л.В. Дударева, Н.В. Семёнова, Н.Б. Катышева, А.В. Рудиковский // Проблемы изучения растительного покрова Сибири: труды VIII Международной научной конференции, посвященной 140-летию Гербария имени П.Н. Крылова, 145-летию Сибирского ботанического сада и 175-летию со дня рождения П.Н. Крылова. – Томск. – 2025. – С. 218-221.
25. Столповский Ю.А. Геномная селекция. I. Последние тенденции и возможные пути развития / Ю.А. Столповский, А.К. Пискунов, Г.Р. Свищева // Генетика. – 2020. – Т. 56. – №. 9. – С. 1006-1017.
26. Тяпкина Д.Ю. Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты / Д.Ю. Тяпкина, Е.З. Кочиева, М.А. Слугина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 3. – С. 270-280.
27. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.
28. Agius F. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase / F. Agius, R. González-Lamothe, J.L. Caballero, J. Muñoz-Blanco, M.A. Botella, V. Valpuesta // Nature biotechnology. – 2003. – V. 21. – №. 2. – P. 177-181.

29. Al-Samarai F.R. Molecular markers: An introduction and applications / F.R. Al-Samarai, A.A. Al-Kazaz // European journal of molecular biotechnology. – 2015. – V. 9. – №. 3. – P. 118-130.
30. Amom T. The use of molecular marker methods in plants: a review / T. Amom, P. Nongdam // International Journal of Current Research and Review. – 2017. – V. 9. – №. 17. – P. 1-7.
31. An H.M. Molecular characterisation and expression of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and L-ascorbic acid accumulation during fruit development in *Rosa roxburghii* / H.M. An, W.G. Fan, L.G. Chen, S. Asghar, Q.L. Liu, // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2007. – V. 82. – №. 4. – P. 627-635.
32. Atkin O.K. Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants / O.K. Atkin, A.H. Millar, P. Gardeström, D.A. Day // Photosynthesis: physiology and metabolism. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. – P. 153-175.
33. Atkinson R.G. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit / R.G. Atkinson, P.W. Sutherland, S.L. Johnston, K. Gunaseelan, I.C. Hallett, D. Mitra, D.A. Brummell, R. Schröder, J.W. Johnston, R.J. Schaffer // BMC plant biology. – 2012. – V. 12. – P. 1-13.
34. Baig M.M. L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulonono-1, 4-lactone and L-galactono-1, 4-lactone / M.M. Baig, S. Kelly, F. Loewus // Plant Physiology. – 1970. – V. 46. – №. 2. – P. 277-280.
35. Bassi M. Ascorbic acid content in apple pulp, peel, and monovarietal cloudy juices of 64 different cultivars / M. Bassi, G. Lubes, F. Bianchi, S. Agnolet, F. Ciesa, K. Brunner, W. Guerra, P. Robatscher, M. Oberhuber // International Journal of Food Properties. – 2017. – V. 20. – P. S2626-S2634.
36. Bhatla S.C. Metabolism of Storage Carbohydrates / M.A. Lal, S.C. Bhatla // Plant Physiology, Development and Metabolism. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. – P. 231-259.

37. Bianchi F. L-ascorbic acid and α -tocopherol content in apple pulp: A comparison between 24 cultivars and annual variations during three harvest seasons / F. Bianchi, E. Soini, F. Ciesa, L. Bortolotti, W. Guerra, P. Robatscher, M. Oberhuber // *International Journal of Food Properties*. – 2020. – V. 23. – №. 1. – P. 1624-1638.
38. Bielecki R.L. Accumulation and translocation of sorbitol in apple phloem / R.L Bielecki // *Australian Journal of Biological Sciences*. – 1969. – V. 22. – №. 3. – P. 611-620.
39. Biliska K. Ascorbic acid—The little-known antioxidant in woody plants / K. Biliska, N. Wojciechowska, S. Alipour, E.M Kalembe // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8. – №. 12. – P. 645.
40. Blanke M.M. Fruit photosynthesis / M.M. Blanke, Lenz F. // *Plant, Cell & Environment*. – 1989. – V. 12. – №. 1. – P. 31-46.
41. Broothaerts W. Apple self-incompatibility genotypes: an overview / W. Broothaerts I. Van Nerum // *XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts* 622. – 2002. – P. 379-387.
42. Brown S.K. Genetics of apple / S.K. Brown, J. Janick // *Plant breeding reviews*. – 1992. – V. 9. – P. 333-366.
43. Buettner G.R. Free radicals, oxidants, and antioxidants / G.R. Buettner, F.Q. Schafer // *Teratology*. – 2000. – V. 62. – №. 4. – P. 234-234.
44. Bulley S. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the l-galactose pathway gene GDP-l-galactose phosphorylase / S. Bulley, M. Wright, C. Rommens, H. Yan, M. Rassam, K. Lin-Wang, C. Andre, D. Brewster, S. Karunairetnam, A. C. Allan, W.A. Laing // *Plant biotechnology journal*. – 2012. – V. 10. – №. 4. – P. 390-397.
45. Burns J.J. Ascorbic acid / J.J. Burns. // *Metabolic pathways*. – Academic press, 1967. – P. 394-411.
46. Caffall K.H. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides / K.H. Caffall, D. Mohnen // *Carbohydrate research*. – 2009. – V. 344. – №. 14. – P. 1879-1900.

47. Cao L. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review / L. Cao, W. Lu, A. Mata, K. Nishinari, Y. Fang // Carbohydrate polymers. – 2020. – V. 242. – P. 116389.
48. Cerri M. Anatomical traits of the principal fruits: An overview / M. Cerri, L. Reale // Scientia Horticulturae. – 2020. – V. 270. – P. 109390.
49. Chen J. Pectin modifications: a review / J. Chen, W. Liu, C.M. Liu, T. Li, R.H. Liang, S.J. Luo // Critical reviews in food science and nutrition. – 2015. – V. 55. – №. 12. – P. 1684-1698.
50. Chen T. Molecular basis for optimizing sugar metabolism and transport during fruit development / T. Chen, Z. Zhang, B. Li, G. Qin, S. Tian // Abiotech. – 2021. – P. 1-11.
51. Chen X. Sequencing of a wild apple (*Malus baccata*) genome unravels the differences between cultivated and wild apple species regarding disease resistance and cold tolerance / X. Chen, S. D. Li, Han M, Zhang, X. Jin, C. Zhao, S. Wang, L. Xing, J. Ma, J. Ji, N. An // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2019. – V. 9. – №. 7. – P. 2051-2060.
52. Ciereszko I. Regulatory roles of sugars in plant growth and development / I. Ciereszko // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2018. – V. 87. – №. 2.
53. Conklin P.L. L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtc1* / P.L. Conklin, J.E. Pallanca, R.L. Last, N. Smirnoff, // Plant Physiology. – 1997. – V. 115. – №. 3. – P. 1277-1285.
54. Cornille A. New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties / A. Cornille, P. Gladieux, M. J. M. Smulders, Isabel Roldan-Ruiz, F. Laurens(et al.) // PLoS genetics. – 2012. – V. 8. – №. 5. – Art. e1002703.
55. Costa G. Physiological, molecular and practical aspects of fruit abscission / G. Costa V. Dal Cin, A. Ramina // X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production 727. – 2005. – P. 301-310.

56. Cruz-Rus E. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries / E. Cruz-Rus, M.A. Botella, V. Valpuesta, M.C. Gomez-Jimenez, // Journal of Plant Physiology. – 2010. – V. 167. – №. 9. – P. 739-748.
57. Daher F.B. How to let go: pectin and plant cell adhesion / F.B. Daher, S.A. Braybrook // Frontiers in plant science. – 2015. – V. 6. – P. 523.
58. Davey M.W. Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture / M. W. Davey, C. Gilot, G. Persiau, J. Østergaard, Y. Han, G.C. Bauw, M.C. Van Montagu, // Plant Physiology. – 1999. – V. 121. – №. 2. – P. 535-544.
59. Davey M.W. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing / M.W. Davey, M.V. Montagu, D. Inze, M. Sanmartin, A. Kanellis (et al.) // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2000. – V. 80. – №. 7. – P. 825-860.
60. Delmer D. The plant cell wall—dynamic, strong, and adaptable—is a natural shapeshifter / D. Delmer, R.A. Dixon, K. Keegstra, D. Mohnen // The Plant Cell. – 2024. – V. 36. – №. 5. – P. 1257-1311.
61. Dewhirst R.A. The oxidation of dehydroascorbic acid and 2, 3-diketogulonate by distinct reactive oxygen species / R.A. Dewhirst, S.C. Fry // Biochemical Journal. – 2018. – V. 475. – №. 21. – P. 3451-3470.
62. Dranca F. Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* «Falticeni» apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques / F. Dranca, M. Vargas, M. Oroian // Food Hydrocolloids. – 2020. – V. 100. – P. 105383.
63. Dumville J.C., S.C. Fry Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening / J.C. Dumville, S.C. Fry // Planta. – 2003. – V. 217. – №. 6. – P. 951-961.
64. Ebert B. The three members of the Arabidopsis glycosyltransferase family 92 are functional β -1, 4-galactan synthases / B. Ebert, D. Birdseye, A.J. Liwanag, T. Laursen, E.A. Rennie // Plant and Cell Physiology. – 2018. – V. 59. – №. 12. – P. 2624-2636.

65. Eccher G. Apple (*Malus domestica* L. Borkh) as an emerging model for fruit development / G. Eccher, S. Ferrero, F. Populin, L. Colombo, A. Botton // Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. – 2014. – V. 148. – №. 1. – P. 157-168.
66. Escobar-Gutiérrez A. Distribution, metabolism and role of sorbitol in higher plants. A review. / A. Escobar-Gutierrez // Agronomie – 1996.
67. Eveland A.L. Sugars, signalling, and plant development / A.L. Eveland, D.P. Jackson // Journal of experimental botany. – 2012. – V. 63. – №. 9. – P. 3367-3377.
68. Fang T. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples/ T. Fang, Q. Zhen, L. Liao, A. Owiti, L. Zhao, S.S. Korban, Y. Han // Food chemistry. – 2017. – V. 225. – P. 132-137.
69. Fenech M. Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation / M. Fenech, I. Amaya, V. Valpuesta, M.A. Botella // Frontiers in plant science. – 2019. – V. 9. – P. 2006.
70. Figueroa C.R. Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria × ananassa* fruits / C.R. Figueroa, H.G. Rosli, P.M. Civello, G.A. Martínez, R. Herrera, M.A. Moya-León // Scientia Horticulturae. – 2010. – V. 124. – №. 4. – P. 454-462.
71. Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub / C.H. Foyer, G. Noctor // Plant physiology. – 2011. – V. 155. – №. 1. – P. 2-18.
72. Foyer C.H. Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives, and outstanding issues / C. H. Foyer, T. Kyndt, R.D. Hancock // Antioxidants & Redox Signaling. – 2020. – V. 32. – №. 7. – P. 4.
73. Foyer C.H., Kunert K. The ascorbate–glutathione cycle coming of age / C.H. Foyer, K. Kunert // Journal of Experimental Botany. – 2024. – V. 75. – №. 9. – P. 2682-2699.
74. Franceschi V.R. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants / V.R. Franceschi, N.M. Tarlyn // Plant Physiology. – 2002. – V. 130. – №. 2. – P. 649-656.

75. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth / D.R. Gallie // *Journal of experimental botany*. – 2013. – V. 64. – №. 2. – P. 433-443.
76. Garrido A. Fruit photosynthesis: more to know about where, how and why / A. Garrido, A. Conde, J. Serôdio, R.C De Vos, A. Cunha // *Plants*. – 2023. – V. 12. – №. 13. – Art. 2393.
77. Gawkowska D. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. / D. Gawkowska, J. Cybulska, A. Zdunek // *Polymers*. – 2018. – V. 10. – №. 7. – P. 762.
78. Gest N. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? / N. Gest, H. Gautier, R. Stevens // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – V. 64. – №. 1. – P. 33-53.
79. Goldberg R. Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall / R. Goldberg, C. Morvan, A. Jauneau, M.C. Jarvis // *Progress in biotechnology*. – Elsevier, 1996. – V. 14. – P. 151-172.
80. Grace S.C. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species / S.C. Grace, B. A. Logan // *Plant physiology*. – 1996. – V. 112. – №. 4. – P. 1631-1640.
81. Gross B.L. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and its wild relatives / B.L. Gross, A.D. Henk, P.L. Forsline, C.M. Richards, G.M. Volk // *Tree Genetics & Genomes*. – 2012. – V. 8. – P. 1223-1235
82. Guo S. The evolving views of the simplest pectic polysaccharides: Homogalacturonan / S. Guo, M. Wang, X. Song, G. Zhou, Y. Kong // *Plant cell reports*. – 2022. – V. 41. – №. 11. – P. 2111-2123.
83. Hacısevki A. An overview of ascorbic acid biochemistry / A. Hacısevki // *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. – 2009. – V. 38. – №. 3. – P. 233-255.
84. Hamner K.C. Effects of light intensity, day length, temperature, and other environmental factors on the ascorbic acid content of tomatoes / K.C. Hamner,

L. Bernstein, L.A Maynard // The Journal of Nutrition. – 1945. – V. 29. – №. 2. – P. 85-97.

85. Hancock J.F. Temperate fruit crop breeding: germplasm to genomics. – Springer Science & Business Media – 2008 – 456 p.

86. Hancock R.D. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants / R.D Hancock, R. Viola // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2005. – V. 24. – №. 3. – P. 167-188.

87. Hancock R.D. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem / R.D. Hancock, D. McRae, S. Haupt, R. Viola // BMC Plant Biology. – 2003. – V. 3. – P. 1-13.

88. Harada T. Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species / T. Harada, W. Kurahashi, M. Yanai, Y. Wakasa, T. Satoh // Scientia horticulturae. – 2005. – V. 105. – №. 4. – P. 447-456.

89. Harholt J. Biosynthesis of pectin / J. Harholt, A. Suttangkakul, H. Vibe Scheller // Plant physiology. – 2010. – V. 153. – №. 2. – P. 384-395.

90. Haroldsen V.M. Constitutively expressed *DHAR* and *MDHAR* influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato / V. M. Haroldsen, C.L. Chi-Ham, S. Kulkarni, A. Lorence, A.B. Bennett // Plant Physiology and Biochemistry. – 2011. – V. 49. – №. 10. – P. 1244-1249.

91. Höfer M. Phenotypic evaluation and characterization of a collection of *Malus* species / M. Höfer, M.A.M.S. Eldin Ali, J. Sellmann, A. Peil // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2014. – V. 61. – P. 943-964.

92. Horemans N. Ascorbate function and associated transport systems in plants / N. Horemans, C.H. Foyer, G. Potters, H. Asard // Plant physiology and biochemistry. – 2000. – V. 38. – №. 7-8. – P. 531-540.

93. Horemans N. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane / N. Horemans, C.H. Foyer, H. Asard // Trends in plant science. – 2000. – V. 5. – №. 6. – P. 263-267.

94. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

95. Ignatov A. *Malus* / A. Ignatov, A. Bodishevskaya // Wild crop relatives: genomic and breeding resources: temperate fruits. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. – P. 45-64.
96. Ioannidi E. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions / E. Ioannidi, M.S. Kalamaki, C. Engineer, I. Pateraki, D. Alexandrou // Journal of experimental botany. – 2009. – V. 60. – №. 2. – P. 663-678.
97. Isherwood F.A., Mapson L.W. Ascorbic acid metabolism in plants: Part II. Biosynthesis / F.A. Isherwood, L.W. Mapson // Annual Review of Plant Physiology. – 1962. – V. 13. – №. 1. – P. 329-350.
98. Ishii T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides / T. Ishii // Plant Science. – 1997. – V. 127. – №. 2. – P. 111-127.
99. Ishikawa T. Biosynthesis and regulation of ascorbic acid in plants / T. Ishikawa, T. Maruta, K. Yoshimura, N. Smirnoff // Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. – 2018. – P. 163-179.
100. Ishikawa T. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants / T. Ishikawa, J. Dowdle, N. Smirnoff // Physiologia Plantarum. – 2006. – V. 126. – №. 3. – P. 343-355.
101. Janssen B.J. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit / B.J. Janssen, K. Thodey, R.J. Schaffer, R. Alba, L. Balakrishnan (et al.) // BMC Plant biology. – 2008. – V. 8. – P. 1-29.
102. Jardim-Messeder D. Ascorbate-glutathione cycle genes families in *Euphorbiaceae*: Characterization and evolutionary analysis / D. Jardim-Messeder, Y. de Souza-Vieira, L.C. Lavaquial, D. Cassol, V. Galhego (et al.) // Biology. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 19.
103. Jarvis M.C. Plant cell walls: supramolecular assembly, signalling and stress / M.C. Jarvis // Structural Chemistry. – 2009. – V. 20. – P. 245-253.
104. Juniper B. E., Watkins R., Harris S. A. The origin of the apple // Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 484. – 1996. – P. 27-34.

105. Juniper B.E. The origin of the apple / B.E. Juniper, R. Watkins, S.A. Harris // Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 484. – 1996. – P. 27-34.
106. Kolarič J. Abscission of young apple fruits (*Malus domestica* Borkh.): A review. / J. Kolarič // Agricultura. – 2010. – V. 7. – P. 31-36.
107. Kumar S. Breeding for apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) fruit quality traits in the genomics era / S. Kumar, R.K. Volz, D. Chagné, S. Gardiner // Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 2. Crop productivity, food security and nutritional quality. – 2014. – P. 387-416.
108. Lemmens E. Dynamics of ascorbic acid content in apple (*Malus x domestica*) during fruit development and storage / E. Lemmens, E. Alós, M. Rymenants, N. De Storme, W.J. Keulemans // Plant Physiology and Biochemistry. – 2020. – V. 151. – P. 47-59.
109. Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure / R. Lemoine // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2000. – V. 1465. – №. 1-2. – P. 246-262.
110. Lerouxel O. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process / O. Lerouxel, D.M. Cavalier, A.H. Liepman, K. Keegstra // Current opinion in plant biology. – 2006. – V. 9. – №. 6. – P. 621-630.
111. Li M. Ascorbic acid accumulation and expression of genes involved in its biosynthesis and recycling in developing apple fruit / M. Li, X. Chen, P. Wang, F. Ma // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2011. – V. 136. – №. 4. – P. 231-238.
112. Li M. Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits / M. Li, F. Ma, P. Shang, M. Zhang, C. Hou, D. Liang // Planta. – 2009. – V. 230. – P. 39-51.
113. Li M.J. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala) / M.J. Li, F.W. Ma, M. Zhang, F. Pu // Plant Science. – 2008. – V. 174. – №. 6. – P. 606-612.

114. Li Q. Enhanced ascorbic acid accumulation through overexpression of dehydroascorbate reductase confers tolerance to methyl viologen and salt stresses in tomato / Q. Li, Y. Li, C. Li, X. Yu // Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2012. – V. 48. – №. 2. – P. 74-86.
115. Liao G. L-Ascorbic acid metabolism and regulation in fruit crops / G. Liao, Q. Xu, A.C. Allan, X. Xu // Plant Physiology. – 2023. – V. 192. – №. 3. – P. 1684-1695.
116. Liao G. Three metabolic pathways are responsible for the accumulation and maintenance of high AsA content in kiwifruit (*Actinidia eriantha*) / G. Liao, L. Chen, Y. He, X. Li, Z. Lv (et al.) // BMC genomics. – 2021. – V. 22. – P. 1-11.
117. Linster C.L. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2 / C.L. Linster, S.G. Clarke // Trends in plant science. – 2008. – V. 13. – №. 11. – P. 567-573.
118. Lionetti V. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases / V. Lionetti, F. Cervone, D. Bellincampi // Journal of Plant Physiology. – 2012. – T. 169. – №. 16. P. 1623-1630.
119. Liu F. Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry / F. Liu, L. Wang, L. Gu, W. Zhao, H. Su, X. Cheng // Food chemistry. – 2015. – V. 188. – P. 399-405.
120. Liu H. Genome-wide analysis of ascorbic acid metabolism related genes in *Fragaria × ananassa* and its expression pattern analysis in strawberry fruits / H. Liu, L. Wei, Y. Ni, L. Chang, J. Dong, // Frontiers in Plant Science. – 2022. – V. 13. – P. 954505.
121. Liu Y.J. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses / Y.J. Liu, Y. Yuan, Y.Y. Liu, Y. Liu, J.J. Fu, J. Zheng, G.Y. Wang // Journal of Plant Physiology. – 2012. – V. 169. – №. 2. – P. 183-192.

122. Loewus F.A. Tracer studies on ascorbic acid formation in plants / F.A. Loewus // *Phytochemistry*. – 1963. – V. 2. – №. 2. – P. 109-128.
123. Loewus M.W. Conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf / M.W. Loewus, D.L. Bedgar, K. Saito, F.A. Loewus // *Plant Physiology*. – 1990. – V. 94. – №. 3. – P. 1492-1495.
124. Luo Y. Sucrose promotes strawberry fruit ripening and affects ripening-related processes / Y. Luo, Y. Lin, F. Mo, C. Ge, L. Jiang (et al.) // *International Journal of Genomics*. – 2019. – V. 2019. – №. 1. – P. 9203057.
125. Ma S. Phloem unloading strategies and mechanisms in crop fruits / S. Ma, Y. Li, X. Li, X. Sui, Z. Zhang // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2019. – V. 38. – P. 494-500.
126. Malladi A. Molecular physiology of fruit growth in apple / A. Malladi // *Horticultural reviews*. – 2020. – V. 47. – P. 1-42.
127. Mapson L.W. Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono- γ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria / L.W. Mapson, F.A. Isherwood, Y.T. Chen // *Biochemical Journal*. – 1954. – V. 56. – №. 1. – P. 21.
128. Mapson L.W. Metabolism of ascorbic acid in plants: Part I. Function / L.W. Mapson // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1958. – V. 9. – №. 1. – P. 119-150.
129. Martínez J.P. Ascorbate–glutathione cycle: enzymatic and non-enzymatic integrated mechanisms and its biomolecular regulation / J.P. Martínez, H. Araya // *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. – P. 303-322.
130. Matos I.F. Ascorbate synthesis as an alternative electron source for mitochondrial respiration: possible implications for the plant performance / I. F. Matos, L.M.M. Morales, D.B. Santana, G.M.C. Silva, M.M.D.A. Gomes (et al.) // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – V. 13. – P. 987077.
131. Matsunaga T. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications

for the evolution of vascular plants/ T. Matsunaga, T. Ishii, S. Matsumoto, M. Higuchi, A. Darvill (et al.) // *Plant physiology*. – 2004. – V. 134. – №. 1. – P. 339-351.

132. Mazid M. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants / M. Mazid, T.A. Khan, Z.H. Khan, S. Quddusi, F. // Mohammad, *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. – 2011. – V. 1. – №. 2. – P. 167-184.

133. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione / A. Meister // *Biochemical Pharmacology*. – 1992. – V. 44. – №. 10. – P. 1905-1915.

134. Mellidou I. Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit / I. Mellidou, D. Chagné, W.A. Laing, J. Keulemans, M.W. Davey // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 160. – №. 3. – P. 1613-1629.

135. Mellidou I. Genetic control of ascorbic acid biosynthesis and recycling in horticultural crops / I. Mellidou, A.K. Kanellis // *Frontiers in Chemistry*. – 2017. – V. 5. – P. 50.

136. Mellidou I. Regulation of vitamin C accumulation for improved tomato fruit quality and alleviation of abiotic stress / I. Mellidou, A. Koukounaras, S. Kostas, E. Patelou, A. K. Kanellis // *Genes*. – 2021. – V. 12. – №. 5. – P. 694.

137. Mittler R. Reactive oxygen gene network of plants / R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem // *Trends in plant science*. – 2004. – V. 9. – №. 10. – P. 490-498.

138. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis / D. Mohnen // *Current opinion in plant biology*. – 2008. – V. 11. – №. 3. – P. 266-277.

139. Navyashree R. Antioxidants in Plants / R. Navyashree // *Advanced Botany*. – 2024. – V. 1.

140. Nguyen-Quoc B. A role for ‘futile cycles’ involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit / B. Nguyen-Quoc, C.H. Foyer // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 52. – №. 358. – P. 881-889.

141. Noiraud N. Transport of polyols in higher plants / N. Noiraud, L. Maurousset, R. Lemoine // Plant Physiology and Biochemistry. – 2001. – V. 39. – №. 9. – P. 717-728.
142. North H.M. Understanding polysaccharide production and properties using seed coat mutants: future perspectives for the exploitation of natural variants / H. M. North, A. Berger, S. Saez-Aguayo, M.C. Ralet // Annals of botany. – 2014. – V. 114. – №. 6. – P. 1251-1263.
143. Ohkawa W. Changes in sugar, titratable acidity, and ascorbic acid content during fruit development in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) / W. Ohkawa, Y. Kanayama, E. Chiba, K. Tiitinen, K. Kanahama // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. – 2009. – V. 78. – №. 3. – P. 288-293.
144. O'Neill M. The pectic polysaccharides of primary cell walls / M. O'Neill, P. Albersheim, A. Darvill // Methods in plant biochemistry. – Academic Press, 1990. – V. 2. – P. 415-441.
145. O'Neill M.A. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide / M. A. O'Neill, T. Ishii, P. Albersheim, A.G. Darvill // Annual Review of Plant Biology. – 2004. – V. 55. – №. 1. – P. 109-139.
146. Ornelas-Paz J.J. Relationship between the firmness of Golden Delicious apples and the physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening / J.D.J Ornelas-Paz, B.M. Quintana-Gallegos, P. Escalante-Minakata, J. Reyes-Hernández, J. D. Pérez-Martínez (et al.) // Journal of food science and technology. – 2018. – V. 55. – P. 33-41.
147. Paciolla C. Vitamin C in plants: from functions to biofortification / C. Paciolla, S. Fortunato, N. Dipierro, A. Paradiso, S. De Leonardis, L. Mastropasqua, M.C. De Pinto // Antioxidants. – 2019. – V. 8. – №. 11. – P. 519.
148. Palin R. The role of pectin in plant morphogenesis / R. Palin, A. Geitmann // Biosystems. – 2012. – V. 109. – №. 3. – P. 397-402.
149. Pallanca J.E. Ascorbic Acid Metabolism in Pea Seedlings. A Comparison of d-Glucosone, l-Sorbosone, and l-Galactono-1, 4-Lactone as

Ascorbate Precursors / J.E. Pallanca, N. Smirnoff // Plant Physiology. – 1999. – V. 120. – №. 2. – P. 453-462.

150. Pandhair V. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview / V. Pandhair, B.S. Sekhon // Journal of plant Biochemistry and Biotechnology. – 2006. – V. 15. – P. 71-78.

151. Pang C.H. Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants / C.H. Pang, B.S. Wang // Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. – 2010. – P. 91-113.

152. Paniagua C. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy / C. Paniagua, S. Posé, V.J. Morris, A.R. Kirby, M.A. Quesada, J.A. Mercado, //Annals of botany. – 2014. – V. 114. – №. 6. – P. 1375-1383.

153. Patova O.A. Pectic polysaccharides: Structure and properties / O.A. Patova, V.V. Golovchenko, Y. S. Ovodov // Russian Chemical Bulletin. – 2014. – V. 63. – P. 1901-1924.

154. Pereira-Lorenzo S. Apple (*Malus* spp.) breeding: present and future / S. Pereira-Lorenzo, M. Fischer, A.M Ramos-Cabrer, I. Castro // Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits: Volume 3. – 2018. – P. 3-29.

155. Perez S. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function / S. Perez, M.A Rodríguez-Carvajal, T. Doco // Biochimie. – 2003. – V. 85. – №. 1-2. – P. 109-121.

156. Popper Z.A. Evolution and diversity of green plant cell walls / Z.A. Popper // Current opinion in plant biology. – 2008. – V. 11. – №. 3. – P. 286-292.

157. Posé S. A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy / S. Posé, C. Paniagua, A. Matas, A.P. Gunning, V.J. Morris // Trends in Food Science & Technology. – 2019. – V. 87. – P. 47-58.,

158. Prasanna V. Fruit ripening phenomena—an overview / V. Prasanna, T.N. Tharanathan // Critical reviews in food science and nutrition. – 2007. – V. 47. – №. 1. – P. 1-19.

159. Quiñones C.O. Alternative pathways leading to ascorbate biosynthesis in plants: lessons from the last 25 years / C.O. Quiñones, R. Gesto-Borroto, R.V. Wilson, S.V. Hernández-Madrigal, A. Lorence // *Journal of Experimental Botany*. – 2024. – V. 75. – №. 9. – P. 2644-2663.
160. Ralet M.C. Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall / M.C. Ralet, G. André-Leroux, B. Quémener, J.F. Thibault // *Phytochemistry*. – 2005. – V. 66. – №. 24. – P. 2800-2814.
161. Reidel E.J. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols / E.J. Reidel, E.A Rennie, V. Amiard, L. Cheng, R. Turgeon // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 149. – №. 3. – P. 1601-1608.
162. Reiter W.D. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants / W.D. Reiter, G.F. Vanzin // *Plant Cell Walls*. – 2001. – P. 95-113.
163. Ridley B.L. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling / B.L. Ridley, M.A. O'Neill, D. Mohnen // *Phytochemistry*. – 2001. – V. 57. – №. 6. – P. 929-967.
164. Robinson J. P. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. / J.P. Robinson, S.A. Harris, B.E. Juniper // *Plant systematics and evolution*. – 2001. – V. 226. – P. 35-58.
165. Rosa M. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants / M. Rosa, C. Prado, G. Podazza, R. Interdonato, J.A. González, M. Hilal, F.E. Prado // *Plant signaling & behavior*. – 2009. – V. 4. – №. 5. – P. 388-393.
166. Rudikovskaya E.G. Peculiarities of accumulation of photoprotective compounds by fruit of Siberian crabapple, *Malus domestica* Borkh. and their hybrids growing in conditions of Eastern Siberia / E.G. Rudikovskaya, L.V. Dudareva, A.A. Shishparenok, S.V. Osipova, Z.O. Stavitskaya, A.V. Rudikovskii // *Scientia Horticulturae*. – 2019. – V. 253. – P. 303-308.
167. Saffer A.M. Expanding roles for pectins in plant development / A.M. Saffer // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2018. – V. 60. – №. 10. – P. 910-923.

168. Saito K. D-Glucosone and L-sorbose, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves / K. Saito, J.A. Nick, F.A. Loewus // *Plant Physiology*. – 1990. – V. 94. – №. 3. – P. 1496-1500.
169. Scalzo J. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit / J. Scalzo, A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti, M. Battino // *Nutrition*. – 2005. – V. 21. – №. 2. – P. 207-213.
170. Sedov E.N. Apple breeding programs and methods, their development and improvement / E.N. Sedov // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2014. – V. 4. – P. 43-51.
171. Sénéchal F. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants / F. Sénéchal, C. Wattier, C. Rustérucci, J. Pelloux // *Journal of experimental botany*. – 2014. – V. 65. – №. 18. – P. 5125-5160
172. Smirnoff N. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function / N. Smirnoff, G.L. Wheeler // *Critical reviews in plant sciences*. – 2000. – V. 19. – №. 4. – P. 267-290.
173. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals / N. Smirnoff // *Free radical biology and medicine*. – 2018. – V. 122. – P. 116-129.
174. Smirnoff N. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance / N. Smirnoff, P.L. Conklin, F.A. Loewus // *Annual review of plant biology*. – 2001. – V. 52. – №. 1. – P. 437-467.
175. Smirnoff N. The ascorbate biosynthesis pathway in plants is known, but there is a way to go with understanding control and functions / N. Smirnoff, G.L. Wheeler // *Journal of Experimental Botany*. – 2024. – V. 75. – №. 9. – P. 2604-2630.
176. Sozaeva D.R. The pectin content in different types of fruit crops and their physicochemical characteristics / D.R. Sozaeva, A.S. Dzhaboeva, L.G. Shaova, O.K. Tsagoeva, // *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. – 2016. – №. 2. – P. 170-174.
177. Stavitskaya Z. Evaluation of the carbohydrate composition of crabapple fruit tissues native to Northern Asia / Z. Stavitskaya, L. Dudareva, A. Rudikovskii,

L. Garkava-Gustavsson, E. Shabanova, A. Levchuk, E. Rudikovskaya // *Plants*. – 2023. – V. 12. – №. 19. – P. 3472.

178. Stevens R. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress / R. Stevens, D. Page, B. Gouble, C. Garchery, D. Zamir, M. Causse // *Plant, cell & environment*. – 2008. – V. 31. – №. 8. – P. 1086-1096.

179. Stumpf W. The biochemistry of plants: carbohydrates / W. Stumpf, P. M. Conn, J. Preiss– Academic Press, 2012. – V. 14.

180. Suekawa M. Physiological role of ascorbic acid recycling enzymes in plants / M. Suekawa, Y. Fujikawa, M. Esaka // *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. – Cham: Springer International Publishing, 2018. – P. 355-373.

181. Suekawa M. Regulation of ascorbic acid biosynthesis in plants / M. Suekawa, T. Kondo, Y. Fujikawa, M. Esaka // *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. – 2017. – P. 157-176.

182. Sun J. Phylogeny of *Maleae* (Rosaceae) based on multiple chloroplast regions: implications to genera circumscription / J. Sun, S. Shi, J. Li, J. Yu, L. Wang (et al.) // *BioMed Research International*. – 2018. – V. 2018. – №. 1. – P. 7627191.

183. Szarka A. Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain / A. Szarka, N. Horemans, Z. Kovács, P. Gróf, M. Mayer, G. Bánhegyi // *Physiologia Plantarum*. – 2007. – V. 129. – №. 1. – P. 225-232.

184. Tao H. New insights on «GALA» apple fruit development: Sugar and acid accumulation: A transcriptomic approach / H. Tao, H. Sun, Y. Wang, X. Song, Y. Guo // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2020. – V. 39. – P. 680-702.

185. Taylor K.A. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid / K.A. Taylor, J.G. Buchanan-Smith // *Analytical Biochemistry*. – 1992. – V. 201. – №. 1. – P. 190-196.

186. Teo G. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality / G. Teo, Y. Suzuki, S.L. Uratsu, B. Lampinen, N. Ormonde

(et al.) // Proceedings of the national academy of sciences. – 2006. – V. 103. – №. 49. – P. 18842-18847.

187. Tharanathan R.N. Plant carbohydrates—an overview / R.N. Tharanathan, G. Muralikrishna, P.V. Salimath, M.R. Rao // Proceedings: Plant Sciences. – 1987. – V. 97. – P. 81-155.

188. Tijero V. Fruit development and primary metabolism in apple / V. Tijero, F. Girardi, A. Botton // Agronomy. – 2021. – V. 11. – №. 6. – P. 1160.

189. Upadhyaya C.P. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance / C.P. Upadhyaya, K. E Young, N. Akula, H. Soon Kim, J.J. Heung (et al.) // Plant science. – 2009. – V. 177. – №. 6. – P. 659-667.

190. Velasco R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) / R. Velasco, A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro (et al.) // Nature genetics. – 2010. – V. 42. – №. 10. – P. 833-839.

191. Voragen A.G.J. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls / A.G. Voragen, G.J. Coenen, R.P. Verhoef, H.A. Schols // Structural Chemistry. – 2009. – V. 20. – P. 263-275.

192. W. Patrick J., C. Botha F., G. Birch R. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants / J W. Patrick, F C. Botha, R G. Birch // Plant biotechnology journal. – 2013. – V. 11. – №. 2. – P. 142-156.

193. Wang D. Fruit softening: revisiting the role of pectin / D. Wang, T.H. Yeats, S. Uluisik, J.K. Rose, G.B. Seymour // Trends in plant science. – 2018. – V. 23. – №. 4. – P. 302-310.

194. Wang J. Regulation of ascorbic acid synthesis in plants / J. Wang, Z. Zhang, R. Huang // Plant signaling & behavior. – 2013. – V. 8. – №. 6. – Art. e24536.

195. Wang N. *Malus sieversii*: the origin, flavonoid synthesis mechanism, and breeding of red-skinned and red-fleshed apples / N. Wang, S. Jiang, Z. Zhang, H. Fang, H. Xu (et al.) // Horticulture research. – 2018. – V. 5.

196. Wang Y. Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two jujube species with differences in ascorbic acid content / Y. Wang, G. Song, D. Liang, H.

Xia, H. Zhang (et al.) // Horticulture, Environment, and Biotechnology. – 2022. – V. 63. – №. 5. – P. 759-767.

197. Wang Y. Identification of the GDP-l-galactose phosphorylase gene as a candidate for the regulation of ascorbic acid content in fruits of *Capsicum annuum* L. / Y. Wang, Z. Wang, S. Geng, H. Du, B. Chen (et al.) // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 8. – P. 7529.

198. Wheeler G.L. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants / G.L. Wheeler, M.A. Jones, N. Smirnoff // Nature. – 1998. – V. 393. – №. 6683. – P. 365-369.

199. Willats W.G. T. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis / W.G.T. Willats, L. McCartney, W. Mackie, J.P. Knox // Plant molecular biology. – 2001. – V. 47. – P. 9-27.

200. Wolucka B. GDP-mannose 3', 5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants / B.A. Wolucka, M. Van Montagu // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278. – №. 48. – P. 47483-47490.

201. Wu H.C. Pectin methylesterases: cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress / H. C. Wu, V.P. Bulgakov, T.L. Jinn // Frontiers in plant science. – 2018. – V. 9. – Art. 1612.

202. Wu P. Multiple physiological and biochemical functions of ascorbic acid in plant growth, development, and abiotic stress response / P. Wu, B. Li, Y. Liu, Z. Bian, J. Xiong, Y. Wang, B. Zhu // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25. – №. 3. – P. 1832.

203. Yamaki S. Metabolism and accumulation of sugars translocated to fruit and their regulation / S. Yamaki // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. – 2010. – V. 79. – №. 1. – P. 1-15.

204. Yapo B.M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins — A new hypothetical model / B.M. Yapo // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 86. – №. 2. – P. 373-385.

205. Zandleven J. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana* / J. Zandleven, S.O. Sørensen, J. Harholt, G. Beldman, H.A. Schols, H.V. Scheller, A.J. Voragen // *Phytochemistry*. – 2007. – V. 68. – №. 8. – P. 1219-1226.
206. Zdunek A. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides / A. Zdunek, P.M. Pieczywek, J. Cybulska // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2021. – V. 20. – №. 1. – P. 1101-1117.
207. Zechmann B. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants / B. Zechmann, M. Stumpe, F. Mauch // *Planta*. – 2011. – V. 233. – P. 1-12.
208. Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants / B. Zechmann // *Plant Signaling & Behavior*. – 2011. – V. 6. – №. 3. – P. 360-363.
209. Zhang L.Y. Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit / L.Y. Zhang, Y.B. Peng, S. Pelleschi-Travier, Y. Fan, Y. F. Lu (et al.) // *Plant physiology*. – 2004. – V. 135. – №. 1. – P. 574-586.
210. Zhang Y. Ascorbic acid in plants: biosynthesis, regulation and enhancement. – Springer Science & Business Media, 2012.
211. Zhang Y.J. Molecular properties and functional divergence of the dehydroascorbate reductase gene family in lower and higher plants / Y.J. Zhang, W. Wang, H.L. Yang, Y. Li, X.Y. Kang (et al.) // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – №. 12. – Art. e0145038.
212. Zhang Z. Evolution and function of MADS-Box transcription factors in plants / Z. Zhang, W. Zou, P. Lin, Z. Wang, Y. Chen (et al.) // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – №. 24. – Art. 13278.
213. Zubini P. Expression of anti-oxidant enzyme genes in scald-resistant «Belfort» and scald-susceptible «Granny Smith» apples during cold storage / P. Zubini, E. Baraldi, D. Santis, P. Bertolini, M. Mari // *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2007. – V. 82. – №. 1. – P. 149-155.