

тях (в частности, регуляции гормонального сигналинга), через нитрозилирование остатков цистеина в полипептидной цепи. Ранее было показано, что тестируемые сиднонимины В1-01 и SP-13 проявляли протекторные свойства, а В1-05 – гербицидные. После проведения предварительной оценки стресс-ответа растений гороха на физиологическом и биохимическом уровне, был выполнен протеомный анализ семян молочной спелости в трех вариантах обработки сиднониминами: предобработка семян, обработка листьев или комбинированная обработка. Для этого было проведено выделение тотальной фракции белка семян, которая была подвергнута ограниченному протеолизу трипсином и проанализирована с помощью нанопоточной обратнофазовой жидкостной хроматографией, сопряженной онлайн с масс-спектрометром Orbitrap Fusion Tribrid (nanoRP-HPLC-LIT/Q-Orbitrap-MS). Статистический анализ на базе программного обеспечения Protome Discoverer 2.2, Progenesis Q1 с последующей обработкой данных в среде программирования R позволил выявить белки, дифференциально-экспрессированные в ответ на воздействие засухи и сиднониминнов, установить их функциональные классы и субклеточную локализацию. В результате было выдвинуто предположение о протекторном потенциале исследуемых веществ.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда (проект 22-26-00337).

Роль антрахинона париетина в устойчивости к обезвоживанию талломов лишайника *Xanthoria parietina*

**Даминова А. Г.^{А*}, Лексин И. Ю.^А, Хабибрахманова В. Р.^А,
Гурьянов О. П.^А, Галеева Е. И.^А, Трифонова Т. В.^А, Beckett R. P.^Б,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

*E-mail: daminova.ag@gmail.com

^Б School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Scottsville, South Africa

Лишайники представляют собой фотосинтезирующие симбиотические ассоциации, таллом которых образован двумя основными партнерами – микобионтом (грибной партнер, в основном, аскомицеты) и фотобионтом (водоросль или цианобактерии) (Eisenreich et al., 2011). Лишайники отличаются разнообразием форм и цвета и могут произрастать на поверхности почти каждого субстрата, включая почву, камни, кору деревьев. Лишайники относят к экстремофильным организмам ввиду их феноменальной устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружа-

ющей среды, таких как обезвоживание, перепады температур, ультрафиолетовое (УФ) излучение (Armstrong, 2017). Среди механизмов высокой стрессовой устойчивости лишайников немаловажную роль может играть синтез вторичных метаболитов (Daminova et al., 2022). Большинство работ, посвященные исследованиям вторичных метаболитов, сфокусированы на их потенциальном применении в медицине. Вторичные метаболиты обладают антибиотическими, антимикотическими и противовирусными свойствами (Basile et al., 2015). Например, ярко-оранжевый антрахинон париедин (также называемый фисцион), представляет собой пигмент лишайников рода *Caloplaca* и *Xanthoria*. Однако, париедин можно обнаружить также у покрытосеменных растений, например, в корнях растения *Rumex crispus* (Choi et al., 2004). *Xanthoria parietina* (Ascomycota, Teloschistaceae) это распространенный по всему миру эпифитный вид лишайника, предпочитающий богатые азотом места обитания. Лишайник образует слоевища, цвет которого варьирует от бледно-зеленого до ярко-оранжевого. Пигментация талломов усиливается под воздействием солнечной радиации (Lindblom, Ekman, 2007; Beck, Mayr, 2012). Характерный оранжевый цвет талломов лишайника обусловлен присутствием кристаллов париедина, которые накапливаются, в основном, на поверхности верхнего кортекса (Gauslaa, McEvoy, 2005). Широко изучена фотопротекторная роль париедина при интенсивном УФ-Б (Solhaug, Gauslaa, 2012). Кроме того, показано, что париедин защищает таллом *X. parietina* от токсического действия кадмия, снижая воздействие окислительного стресса, вызванного кадмием (Kalinowski et al., 2015). Однако, защитная роль париедина в устойчивости талломов лишайника *X. parietina* к обезвоживанию, малоизучена на сегодняшний день. Можно предположить, что талломы лишайника *X. parietina*, приобретают ярко-оранжевое окрашивание при воздействии солнечной радиации и нуждаются в дополнительной защите от обезвоживания. Париедин, как антрахинон, является гидрофобным соединением, может способствовать гигроскопичности верхней части корового слоя (Souza-Egipsy et al., 2000). В связи с этим, целью настоящей работы было изучение роли париедина в устойчивости *X. parietina* к обезвоживанию. В литературе представлены единичные работы по характеристике морфологии пигментированных талломов лишайников, что может быть связано со сложностью анатомического строения таллома, взаимодействием грибных и фотосинтезирующих симбионтов и разнообразием путей биосинтеза метаболитов. Морфология и топография талломов лишайника могут обуславливать его физико-химические свойства и физиологические функции. В рамках данной работы нами было проведено сравнение структурных и физиолого-биохимических характеристик трех типов талломов *X. parietina*: бледно-зеленого, ярко-оранжевого и ярко-

оранжевого таллома, из которого париедин был удален путем промывки ацетоном. Ранее Solhaug и Gauslaa продемонстрировали применение этого метода для удаления лишайниковых веществ из талломов с целью сравнения эффектов стрессовых воздействий на талломы с присутствием париедина или без него (Solhaug, Gauslaa, 2004). В нашей работе, гидратированные ярко-оранжевые и промытые ацетоном талломы *X. parietina* выдерживались в эксикаторе над насыщенным раствором CaCl_2 в течение 4 и 14 ч. Скорость потери воды из обоих типов талломов была схожей, и после высушивания в течение 4 ч относительное содержание воды снижалось примерно до 50 %, а через 14 ч — примерно до 10 %. Последующая регидратация в течение 1 ч приводила к почти полному восстановлению относительного содержания воды. Интересно, что при более медленном высыхании над насыщенным раствором NaCl скорость потери воды ярко-оранжевыми талломами была немного медленнее, чем талломами, промытые ацетоном, в течение первых 6 ч, хотя дальнейшая потеря воды (до 24 ч) происходила с одинаковой скоростью в обоих типах талломов. Нами была проведена оценка эффективности фотосинтеза, которая показала, что удаление париедина из предварительно высушенных талломов оказывает незначительное влияние на фотосинтетическую активность, а относительные значения максимальной фотосинтетической активности фотосистемы II в ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломах снижались схожим образом во время обезвоживания. Однако, абсолютные значения активности фотосистемы II были немного ниже в промытых ацетоном талломах лишайника *X. parietina*. Интересно, что Ndhlovu с соавторами обнаружили, что в других видах лишайников (содержащих вторичные метаболиты, отличные от париедина) удаление веществ в целом снижало влияние обезвоживания на активность ФСII *X. parietina* (Ndhlovu et al., 2024). Это может быть вызвано повышением уровня окислительного стресса в лишайниках в отсутствие лишайниковых веществ, обладающих высокой антиоксидантной активностью. В подтверждение данного предположения нами были выявлены различия в общем уровне перекисного окисления липидов в талломах *X. parietina*. Перекисное окисление липидов, определяемое по содержанию малонового диальдегида, в промытых ацетоном талломах значительно увеличивалось во время обезвоживания, тогда как в ярко-оранжевых талломах этот показатель увеличивался лишь незначительно. После регидратации уровень перекисного окисления липидов снижался до исходных значений в обоих типах талломов. Мы предполагаем, что антиоксидантные свойства париедина (Hidalgo et al., 1994) могут снижать уровень перекисного окисления липидов, и, тем самым, повышать стабильность мембран *X. parietina* во время обезвоживания. Индекс ста-

бильности мембран во время цикла обезвоживание/регидратации оставался выше в ярко-оранжевых талломах, чем в непигментированных талломах. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что удаление вторичных метаболитов с внешней поверхности таллома повышает проницаемость мембран во время регидратации после обезвоживания.

С помощью световой микроскопии поперечных срезов бледных талломов *X. parietina* нами были визуализированы слабо пигментированные клетки в верхнем коровом слое, ниже которых находится непигментированный слой микобионта, за которым следует слой фотобионта, включающий *Trebouxia* sp. В ярко-оранжевых талломах был обнаружен темно-коричневый слой на поверхности верхнего кортекса, тогда как в промытых ацетоном талломах этот слой был только слегка пигментирован. С помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии мы визуализировали микроструктуру поперечных срезов бледных, ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломов *X. parietina*. Рельеф поверхности верхнего корового слоя срезов талломов лишайника был неоднородным с углублениями и выпуклостями, содержащими игольчатые кристаллы. Большинство вторичных метаболитов лишайников обычно представляют гидрофобные кристаллы, нерастворимые в воде (Huneck, et al., 1996). Было обнаружено, что у *X. parietina* поверхность верхнего кортекса ярко-оранжевых талломов была толще, чем у бледных талломов. Кроме того, в верхнем коровом слое бледных талломах диаметр пор, представляющих собой просветы грибных гиф, на единицу площади поперечного сечения был примерно в 1,6 раза больше, чем в ярко-оранжевых талломах, что свидетельствует об утолщении клеточных стенок последних. После промывания ярко-оранжевых талломов ацетоном толщина клеточных стенок существенно не изменилась. Анализ ультраструктуры микобионта показал, что вторичные метаболиты накапливались в бледных, ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломах, однако в ярко-оранжевых талломах количество включений, вероятно, содержащих париетин, внутри гиф и в межгифовом пространстве, было выше. В промытых ацетоном талломах включения наблюдались во внутреннем слое между просветами гиф. Накопление париетина внутри клеток и в межгифовом пространстве у *X. parietina*, вероятно, происходит из-за накопления сахара рибитола, который синтезируется фотобионтом и передается микобионту (Pichler et al., 2023). Рибит является предшественником париетина, аккумулируется в гифах микобионта в двух формах в равных количествах с образованием внутриклеточного париетина и внеклеточного кристаллического париетина (Pichler et al., 2023). При визуализации ацетонового экстракта, выделенного из ярко-оранжевого таллома *X. parietina*, нами было обнаружено наличие нерегулярных игольчатых кристаллов париетина. Морфология

париетина, извлеченного из *X. parietina*, была похожа на морфологию коммерческого париетина в ярко-желтом ацетоновом растворе, который также выглядел также как игольчатые кристаллы (Mugas et al., 2021). С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) нами было подтверждено соответствие основного профиля элюирования ацетонового экстракта *X. parietina* профилю стандарта париетина. Количественное определение париетина в ацетоновых экстрактах из бледных и ярко-оранжевых талломов показало, что более высокий уровень этого пигмента обнаруживается в оранжевых талломах по сравнению с бледными талломами, в то время как выход общих экстрагируемых веществ был немного выше из бледных талломов. Нами обнаружено, что обезвоживание талломов вызвало противоположный эффект на выход экстрактивных веществ и содержание париетина в бледных и ярко-оранжевых талломах. В то время как выход экстрактивных веществ из обезвоженных бледных талломов увеличился, у ярко-оранжевых талломов этот показатель значительно (до 50%) снижался. Можно предположить, что из обезвоженных бледных талломов нами извлекались не только внеклеточные, но и внутриклеточные метаболиты. Это может быть результатом повреждения мембран, вызванного окислительным стрессом во время обезвоживания. Присутствие париетина в ярко-оранжевых талломах вероятно предотвращает выход веществ из сухих талломов, однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные экспериментальные доказательства. Содержание париетина снижалось в обезвоженных бледных талломах и немного увеличилось в ярко-оранжевых талломах. После последующей регидратации, независимо от степени пигментации талломов, наблюдалось значительное снижение содержания экстрактивных веществ. Уровень париетина восстанавливался в оранжевых талломах и оставался довольно низким в бледных талломах. Возможно, бледные талломы в целом менее устойчивы к стрессовому воздействию и по сравнению с пигментированными талломами имеют более низкую активность антиоксидантных ферментов. При обезвоживании в бледных талломах париетин, возможно, действует как антиоксидант, что обуславливает снижение содержания париетина. Напротив, ярко-оранжевые талломы, подвергавшиеся воздействию солнечной радиации в течение длительного времени, более устойчивы к стрессу из-за накопления париетина и осмопротекторных метаболитов, таких как полиолы и глицерин, что объясняет более высокую антиоксидантную защиту и морфологические изменения в структуре таллома. С помощью метода термогравиметрии было подтверждена роль париетина в улучшении водного обмена в талломах лишайника и структурной организации ярко-оранжевых талломов *X. parietina*. Таким

образом, в нашей работе мы показали, что присутствие кристаллов оранжевого пигмента париетина влияет на анатомию и физиологию талломов лишайника *X. parietina* при обезвоживании. Париедин может играть защитную роль в устойчивости лишайников при стрессовом воздействии, стабилизируя мембраны микобионта, обеспечивая антиоксидантную защиту, а также формируя структурный барьер в верхнем коровом слое талломов *X. parietina*. Наши результаты представляют новое понимание опосредованных париетином ультраструктурных, физиологических и биохимических механизмов устойчивости лишайника *X. parietina* к стрессовым воздействиям окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 23-14-00327 и частично в рамках выполнения госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Armstrong, R.A. Adaptation of lichens to extreme conditions. In: eds. Shukla V.; Kumar, S.; Kumar, N. Plant adaptation strategies in changing environment. Singapore, Springer, 2017; pp. 1–27.
2. Basile, A.; Rigano, D.; Loppi, S.; Di. Santi, A.; Nebbioso, A.; Sorbo, S.; Conte, B.; Paoli, L.; De Ruberto, F.; Molinari, A.M.; Altucci, L.; Bontempo, P. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 7861–7875.
3. Beck, A.; Mayr, C. Nitrogen and carbon isotope variability in the green-algal lichen *Xanthoria parietina* and their implications on mycobiont-photobiont interactions. *Ecol. Evol.* 2012, 2, 3132–3144.
4. Choi, G.J.; Lee, S.W.; Jang, K.S.; Kim, J.S.; Cho, K.Y.; Kim, J.C. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Protect.* 2004, 23, 1215–21.
5. Daminova, A.G.; Rogov, A.M.; Rassabina, A.E.; Beckett, R.P.; Minibayeva, F.V. Effect of melanization on thallus microstructure in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *J. Fungi.* 2022, 8, 791.
6. Eisenreich, W.; Knispel, N.; Beck, A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochem. Rev.* 2011, 10, 445–456.
7. Gauslaa, Y.; McEvoy, M. Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic Appl. Ecol.* 2005, 6, 75–82.
8. Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E.A. Antioxidant capacity of depsides and depsidones. *Phytochemistry.* 1994, 37, 1585–1587.
9. Huneck, S.; Yoshimura, I.; Huneck, S.; Yoshimura, I. Identification of lichen substances; Springer, Berlin, Heidelberg, 1996; pp. 11–123.
10. Kalinowski, R.; Bačkor, M.; Pawlik-Skowrońska, B. Parietin in the tolerant lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. increases protection of Trebouxia photobionts from cadmium excess. *Ecol. Indic.* 2015, 58, 132–138.
11. Lindblom, L.; Ekman, S. New evidence corroborates population differentiation in *Xanthoria parietina*. *Lichenologist.* 2007, 39, 259–271.

12. Mugas, M. L.; Calvo, G.; Marioni, J.; Céspedes, M.; Martinez, F.; Sáenz, D.; ... Casas, A. Photodynamic therapy of tumour cells mediated by the natural anthraquinone parietin and blue light. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2021, 214, 112089.
14. Ndhlovu, N.T.; Minibayeva, F.; Beckett, R.P. A role for secondary metabolites in desiccation tolerance in lichens. *Microbiol. Res.* 2024, 15, 225–235.
15. Pichler, G.; Grube M.; Muggia L.; Carniel C.F.; Kranner I. How to build a lichen: from metabolite release to symbiotic interplay. *New Phytol.* 2023, 238, 1362–1378.
16. Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant Cell Environ.* 2004, 27, 167–176.
17. Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. *Prog. Botan.* 2012, 73, 283–304.
18. Souza-Egipsy, V.; Valladares, F.; Ascaso, C. Water distribution in foliose lichen species: interactions between method of hydration, lichen substances and thallus anatomy. *Ann. Botan.* 2000, 86, 595–601.

Сигнальный хаб на основе цитоплазматического Ca^{2+} и активных форм кислорода в клетках высших растений

Демидчик В. В.^{А*}

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Растения способны воспринимать внешние факторы посредством широкого спектра рецепторов, передающих информацию на систему вторичных посредников, таких как цитоплазматический Ca^{2+} , циклические нуклеотиды и другие вещества. Некоторые рецепторы непосредственно сопряжены с Ca^{2+} -проницаемыми ионными каналами и могут очень быстро кодировать информацию в форме мощных и разнообразных по форме флуктуаций цитоплазматического Ca^{2+} . В то же время, практически любое внешнее воздействие, в особенности, стрессовое, не обходится без генерации активных форм кислорода (АФК). Этот процесс развивается также быстро, как и Ca^{2+} -сигналы, в ответ на те же факторы, что наводит на мысль об их общей («единой») природе. Более того, АФК способны активировать повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме, а цитоплазматический Ca^{2+} стимулировать работу важнейших ферментов синтеза АФК – НАДФН-оксидаз. В течение последних двух десятилетий нами и другими авторами развивается концепция так-называемого АФК/ Ca^{2+} -хаба – распределительного сигнального центра в плазматической мембране растительной клетки, который управляет разнообразными по силе и качеству внешними сигналами. Данный хаб, вероятно, несет ответственность за распознавание гормональных и других химических сигналов, неспецифические и специфические стрессовые ответы, а также за процессы роста,