

## **Системно-биологический подход к изучению адаптации растений к дефициту кислорода и последующему окислительному стрессу**

**Емельянов В. В.<sup>А\*</sup>**

<sup>А</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия. \*E-mail: bootika@mail.ru*

Выяснение механизмов адаптации растительных организмов к изменяющимся условиям среды обитания является важной проблемой современной биологии. Растения являются облигатными аэробами. Тем не менее, часто они могут оказаться в среде с пониженной концентрацией кислорода (гипоксия) или его полным отсутствием (аноксия). От дефицита кислорода нередко страдают посевы озимых культур в зимне-весенний или осенний периоды. Гипоксия возникает также при весенних паводках и в период летней вегетации от выпадения обильных осадков. В этих условиях посадки культурных растений часто страдают от кислородной недостаточности. Согласно Всемирной продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, среднемировые потери урожая от гипоксии и аноксии составляют от 15 до 50% в год. Растения природных сообществ, обитающие в условиях постоянного переувлажнения или непосредственно в водной среде, также сталкиваются с проблемой недостатка кислорода. В естественной среде обитания вслед за периодом кислородной недостаточности обычно следует восстановление аэробных условий, и растения оказываются в условиях постаноксического окислительного воздействия, которое может способствовать гибели растения даже в том случае, если оно пережило условия аноксии. Поэтому изучение механизмов приспособления растений к условиям кислородной недостаточности и последующей реаэрации представляется важным как для выяснения теоретических основ биологии растений, так и для решения проблем сельского хозяйства с целью снижения потерь урожая и уменьшения неблагоприятного антропогенного воздействия на флору.

Способность адаптироваться к кислородной недостаточности связана с наличием различных морфогенетических, морфологических, физиологических и биохимических приспособлений, многие из которых опосредованы существенными изменениями обмена веществ при аноксии и реаэрации. Эти изменения позволяют устойчивым растениям вырабатывать достаточное количество энергии, поддерживать водное и минеральное питание и даже расти в дефицитной по кислороду среде [1]. Большинство знаний о метаболических перестройках при гипо/аноксии получены методами конвенциональной биохимии, когда целевым способом изучалось содержание того или иного метаболита, белка или их конкретной группы.

В подобной ситуации за рамками исследования могут оказаться существенные изменения уровня других соединений, которые не были изначальной целью анализа. Для решения этих проблем в настоящее время применяются методы системной биологии, в частности, метаболомики и протеомики.

Метаболическое профилирование с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии выявило значительные изменения в метаболомах исследованных растений при недостатке кислорода. В метаболитном спектре, как корней, так и побегов были идентифицированы все основные группы веществ центрального метаболизма. Наиболее широко были представлены сахара. Анализ разных режимов аэрации выявил межвидовые различия метаболических профилей пшеницы (неустойчивое растение) и риса (устойчивое растение), а также различия биохимических перестроек разных органов при действии аноксии. В проростках пшеницы наиболее существенные изменения происходили в интервале 6-24 ч, а у риса — через 3-6 ч воздействия. Показано значительное снижение уровня сахаров (в первую очередь олигосахаридов, гексоз и сахарофосфатов), аккумуляция метаболитов гликолиза (глицерата, пирувата) и брожений (лактат), что отражает стимуляцию анаэробного обмена. На разных этапах действия аноксии накапливались глицерин, шикимат, сукцинат и фумарат, а также аминокислоты, в т.ч. стрессовые метаболиты (аланин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота [ГАМК] и пролин). Сукцинат и глицерин, также как ГАМК и аланин, являются важными анаэробными интермедиатами, образующимися в результате активации альтернативных брожениям анаэробных путей реокисления НАД(Ф)Н [1, 2]. Эти метаболиты менее токсичны для клетки, чем продукты брожений — лактат, ацетальдегид и этанол. Они позволяют поддерживать пул окисленного НАД(Ф)<sup>+</sup>, необходимого для протекания гликолиза. Для риса при аноксии характерно большее накопление стеренов, жирных кислот, глицерина, аминокислот (включая ГАМК), сахарофосфатов и карбоксилатов (шикимата, цитрата, малата, сукцината и фумарата). Пшеница отличалась повышенным уровнем аконитата, глицерата, лактата и диаминов. Впервые выявлено значительное накопление в анаэробном метаболоме пшеницы органических гидроксикислот (2-гидрокси-глутарата, 3-гидроксипропионата, 3- и 4-гидроксипропионата), которые также формируются в реакциях реокисления НАД(Ф)Н. Однако, в отличие от аминокислот, они вместе с лактатом могут вносить суммарный вклад в закисление цитозоля. По-видимому, у пшеницы преобладают гликолиз и молочнокислое брожение, тогда как у риса — анаэробные пути реокисления НАД(Ф)Н, приводящие к обращению дикарбоновой части цикла Кребса, синтезу шикимата, глицерина, функционированию

ГАМК-шунта и постепенной стимуляции липидного обмена, достигающего максимума при продолжительном действии аноксии.

Сходные с рисом изменения метаболома были продемонстрированы и для дикорастущих растений-гидрофитов, обитающих в условиях дефицита кислорода. Метаболомное профилирование проводили в листьях близкородственных пар видов, из которых один — представитель гидрофитной флоры, а другой — неустойчивый к затоплению мезофит, обитающий в условиях нормоксии. Проанализировано более 50 видов растений. Метаболические профили листьев насчитывали от 100 до 400 метаболитов представляющих основные группы веществ центрального метаболизма. Виды гидрофитов, обитающие в условиях переувлажнения или затопления, накапливали аминокислоты, в том числе образованные из интермедиатов гликолиза, пролин и метаболиты ГАМК-шунта (аланин, глутамат, ГАМК, 4-гидроксипируват), глицерин, карбоновые кислоты цикла Кребса (фумарат и сукцинат), гликолиза (глицерат, пируват) и брожений (лактат), то есть проявляли характерные черты анаэробного метаболизма [2]. Наиболее важной группой метаболитов были карбоксилаты: сукцинат, фумарат, пируват, гликолат и лактат. Их уровень был низким у большинства мезофитов и повышенным у большинства гидрофитов. Однако, ряд гидрофитов, таких как рдесты и некоторые болотные вересковые (*Empetrum nigrum* и *Ledum palustre*) отличались пониженным уровнем этих веществ. На примере видов *Ranunculus* показано, что профилирование центрального метаболома позволяет выявлять родственные связи и, наряду с классическими методами вычислительной филогенетики, использующей молекулярно-генетические методы, может быть востребовано при построении филогенетических дендрограмм. Следует заметить, что в предшествующих хемотаксономических исследованиях изучали преимущественно вторичные метаболиты.

Поскольку возвращение условий нормальной аэрации — компонент воздействия гипо/аноксии в природных экосистемах [3], мы изучали его эффекты на метаболомы проростков пшеницы и риса. Краткосрочная (1 ч) реаэрация почти не оказывала действия на метаболомы обоих растений, которые кластеризовались вместе с аноксическими, особенно при продолжительных сроках предшествующей аноксии. 24 ч реаэрация сдвигала метаболом в сторону нормы, особенно у риса после 6 ч аноксии, однако полного возвращения не происходило. Большая отзывчивость после 6 ч бескислородного воздействия могла быть связана с тем, что в этот период переход к более позднему анаэробному ответу ещё окончательно не завершён и было возможно частичное возвращение метаболизма к дистрессовому состоянию. После 24 и 72 ч бескислородного воздействия постановок-

сические метаболиты группировались с аноксическими. У пшеницы реаэрация приводила к повышению уровня сахаров, карбоксилатов (включая аскорбат и лактат), глицерина и аминов. Представленность цитрата, аминокислот, азотистых оснований и жирных кислот, наоборот, снижалась. У риса реаэрация вызывала аккумуляцию гексозофосфатов, сахарозы, аминокислот, стероидов и жирных кислот, тогда как уровни карбоксилатов, как интермедиатов гликолиза и брожений (пируват, лактат), так и цикла Кребса (сукцинат, малат), пентоз и гексоз понижались. Реаэрация приводила к понижению уровней аланина и ГАМК и аккумуляции аспартата и глутамата, что указывает на сдвиги метаболизма к дострессовому состоянию. Накопление 5-оксопролина и малоната может свидетельствовать об усилении окислительного стресса при действии постаноксии.

Окислительный стресс является главным компонентом постаноксического воздействия [3]. При реаэрации продукция пероксида водорода, перекисное окисление липидов и карбонилирование белков у пшеницы стимулировались в большей степени, чем у риса. Под влиянием аноксии и реаэрации у риса наблюдалось быстрое повышение активности каталазы, а также внутри- и внеклеточных гваяколпероксидаз. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла также эффективно функционировали у риса в условиях постаноксии. У пшеницы стимуляции каталазы не происходило, а пероксидаза активировалась только в побегах после краткосрочной аноксии и продолжительной реаэрации. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла инактивировались. Стимуляция антиоксидантных ферментов у риса сопровождалась усилением экспрессии соответствующих генов.

Протеомный анализ методами двумерной гелевой протеомики с последующим трипсинолизом и MALDI-TOF-масс-спектрометрией выявил в проростках риса 82 аннотированных белка, из них 13 уникальных белков в побегах и 8 — в корнях. Характер изменений отдельных белков позволил выделить 4 группы с различной динамикой. В первой группе были белки, содержание которых уменьшалось в стрессовых условиях, такие как малая субъединица РуБисКО, фруктозо-бисфосфат-альдолаза и ряд других ферментов фотосинтеза. Во второй группе были белки, активируемые при аноксии, среди которых — большая субъединица РуБисКО, БТШ70 и PR-b1 белок (pathogenesis-related protein). Наиболее интересной является третья группа белков, накопление которых начиналось при аноксии и достигало пика во время реаэрации. К таковым относились ОЕЕ1 и 2 (oxygen-evolving enhancer proteins 1&2), малые БТШ и PR-белки, связанные с защитой от окислительного стресса и патогенов. Кроме того, промоторы генов, кодирующих эти белки, были обогащены сайтами посадки транскрипционных факторов, связанных со стрессом, в частности, WRKY,

ERF и MYB. Четвёртую группу составляли белки, уровень которых снижался при аноксии и снова возрастал при реэрации, в частности, пероксиредоксин и арабиназа. Весьма любопытно, что не было выявлено белков, специфичных только для постаноксии. Более того, так же, как и в случае метаболомов, протеом после 24 ч аноксии кластеризовался по результатам анализа методом главных компонент вместе с постаноксическим (24 ч), но не с нормоксическим протеомом. Результаты метаболомного и протеомного анализа позволяют заключить, что постаноксия не является самостоятельным стрессором, и её следует считать продолжением воздействия (последствием) аноксии. Растения, устойчивые к дефициту кислорода, обладают устойчивостью и к постаноксическому окислительному воздействию.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 18-04-00157) и РНФ (проект № 22-24-00484). Участие в симпозиуме поддержано Санкт-Петербургским государственным университетом (грант на исходящую академическую мобильность СПбГУ CONF2024\_2 ID: 120787805).

### **Библиографические ссылки**

1. Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol. Commun.* 2018. 63(1):17–31. doi: 10.21638/spbu03.2018.104
2. Yemelyanov V.V., Puzanskiy R.K., Shishova M.F. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(22):16222. doi: 10.3390/ijms242216222
3. Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. 67(1):45–59. doi: 10.1134/S1021443720010203

### **Дифференциальная экспрессия генов стрессового ответа в лишайнике *Xanthoria parietina* при дегидратации и регидратации**

**Ефремова Д. А.<sup>А,Б</sup>, Лексин И. Ю.<sup>А</sup>, Минибаева Ф. В.<sup>А\*</sup>**

<sup>А</sup> Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия;

<sup>Б</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

\*E-mail: fminibayeva@gmail.com

Лишайник – симбиотическая ассоциация, основными компонентами которой являются фотобионт и микобионт. Лишайники относят к экстремофилам благодаря их способности выживать в условиях, крайне неблагоприятных для большинства других организмов. В частности, они обладают высокой устойчивостью к обезвоживанию. Механизмы устойчиво-