

одним из потенциальных механизмов индукции системного биосинтеза стрессовых фитогормонов при действии локальных стимулов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00388).

Анализ профилей экспрессии генов микобионта и фотобионта лишайника *Lobaria pulmonaria* в ответ на УФ-индуцированную меланизацию

Лексин И. Ю.^{А*}, Шелякин М. А.^Б, Минибаева Ф. В.^А

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

^Б Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

*E-mail: lecsinilya@mail.ru

Лишайники являются сложными симбиотическими системами, состоящими из грибного компонента – микобионта и водорослевого – фотобионта (одного или нескольких). Одним из видов стресса, с которым сталкиваются лишайники, является УФ-индуцированный стресс. Ультрафиолетовое излучение является одним из абиотических факторов, способных вызывать серьёзные негативные последствия у живых организмов: окислительный стресс, фотоповреждение биомолекул, а также подавление роста и развития. Механизмы стрессовой устойчивости, позволяющие противостоять воздействию УФ-облучения, включают как биосинтез фотозащитных пигментов, так и устранение отрицательных эффектов, вызванных УФ. Основной причиной токсичности УФ-излучения является образование активных форм кислорода (АФК), которые повреждают белки, липиды, углеводы и ДНК (Gill and Tuteja, 2010). Ввиду этого, воздействие УФ-В может привести к регуляции множества генов, участвующих в утилизации АФК (Sharma *et al.*, 2012; Robson *et al.*, 2019). В настоящее время влияние УФ-излучения на экспрессию генов в высших растениях детально изучено, однако в лишайниках влияние УФ-В излучения на профили экспрессии генов неизвестно. В связи этим, нами было проведено исследование УФ-В индуцированных изменений экспрессии генов на примере лишайника *Lobaria pulmonaria* для микобионта и эукариотического фотобионта – *Symbiochloris reticulata*.

Влияние абиотического стресса на транскриптомы лишайников изучено относительно мало, хотя есть несколько сообщений о влиянии температурного стресса и обезвоживания на экспрессию генов (Junttila *et al.*, 2013; Candotto *et al.*, 2016; Chavarria-Pizarro *et al.*, 2022; Almer *et al.*, 2023). В настоящей работе мы показываем, что воздействие УФ-В на лишайник

L. pulmonaria изменяет экспрессию генов как у микобионта, так и фотобионта. Стоит отметить, что количество УФ-индуцированных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГов) микобионта (1670) превосходило число ДЭГов хлоробионта (344) к 11-ому дню УФ-облучения. Причина наблюдаемых различий заключается в экранировании УФ-излучения верхним корковым слоем таллома (кортексом) лишайника, что обеспечивает защиту хлоробионта. Оценка параметра *browning reflectance index* (BRI) позволила нам количественно оценить УФ-индуцированное потемнение талломов относительно контроля, которое усиливалось с увеличением длительности воздействия УФ-В. Результаты световой микроскопии позволили детально визуализировать пигментацию верхнего кортекса и подтвердить накопление фотопротекторных метаболитов.

Из данных литературы известно, что УФ-В индуцирует биосинтез меланина в *L. pulmonaria* (Gauslaa and Solhaug, 2001), хотя точный тип синтезируемого меланина оставался неясным. В одном из предыдущих сообщений предполагалось, что содержание азота в меланинах *L. pulmonaria* несколько меньше, чем в типичных эумеланинах, но больше, чем в алломеланинах (Mafole *et al.*, 2019). Теоретически это может указывать на то, что меланин в *L. pulmonaria* синтезируется из более чем одного типа мономеров. Наблюдаемое соотношение C:N в выделенных меланинах и данные анализа экспрессии генов позволяют предположить, что большая часть меланина, синтезируемого *L. pulmonaria*, скорее всего, представляет собой эумеланин. У грибов биосинтез эумеланина требует активности фенолоксидаз, таких как тирозиназы и лакказы (относятся к мультимедным оксидазам) (Matee *et al.*, 2016), а УФ-В облучение *L. pulmonaria* приводит к повышению активности генов, кодирующих тирозиназу (*Tyr6*) и мультимедную оксидазу (*MCO1*) (рис. 1).

Тем не менее, мы предполагаем, что биосинтез алломеланина, получаемого из соединений, относящихся к пульвинонам, и производных нафталена, также может иметь место. У *Aspergillus terreus* биосинтез Asp-меланина, мономером которого является пульвинон, требует экспрессии генов, кодирующих как NRPS-подобный фермент, так и тирозиназу (Belozerskaya *et al.*, 2017). У *A. terreus* аспулвинон E может полимеризоваться тирозиназой, что приводит к образованию Asp-меланина (Geib *et al.*, 2019). У *L. pulmonaria* обработка ультрафиолетовыми лучами повышает активность генов *NRPS1* и *NRPS2*, кодирующих NRPS-подобные ферменты, а также генов *Tyr6*, что указывает на возможность синтеза Asp-меланина (рис. 1). Помимо эумеланина и Asp-меланинов, у *L. pulmonaria* также есть гены, гомологичные тем, которые участвуют в биосинтезе DHN-меланина. Так, УФ-В увеличивает экспрессию биосинтетического генного кластера (БГК), который участвует в биосинтезе производного

нафталена. В литературе описан гомолог поликетидсинтазы (PKS) из данного кластера для *A. parvulus*, и показана роль гомологичной PKS в синтезе 2-ацетил-1,3,6,8-тетрагидрокси нафталена (Mosunova *et al.*, 2023). Данное соединение после ряда химических преобразований может служить мономером DHN-подобных меланинов или выступать в качестве самостоятельного фотопротекторного соединения.

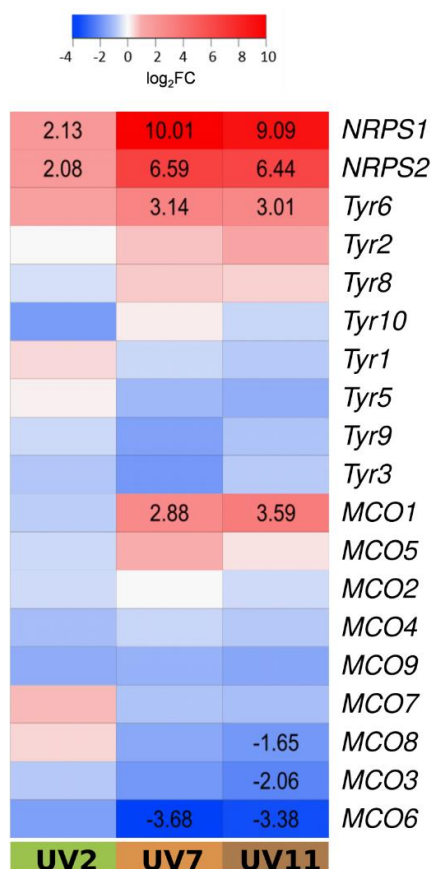


Рис 1. Тепловая карта на основе значений $\log_2FC$ для предполагаемых генов биосинтеза эумеланина (Tyr и MCO) и Asp-меланина (NRPS и Tyr). Наличие значения $\log_2FC$ ($\log_2$ -трансформированные изменения экспрессии относительно контроля) в ячейках тепловой карты указывает на статистически значимые изменения для гена ($p\text{-value} < 0,05$). Tyr – тирозиназа, MCO – мультимедная оксидаза, NRPS – NRPS-подобный фермент, UV2 – 2-ой день УФ-облучения, UV7 – 7-ой день УФ-облучения, UV11 – 11-ый день УФ-облучения

Помимо генов и БГК биосинтеза потенциальных мономеров меланинов, мы также выявили БГК, участвующие в синтезе антрахинонов и ксантонов. Известно, что эти соединения относятся к фотопротекторным соединениям (Nguyen *et al.*, 2013; Goga *et al.*, 2020), а также обладают антиоксидантной активностью (Wu *et al.*, 2018) и могут снижать общий окислительный стресс, вызванный УФ-В.

В настоящем исследовании мы обнаружили ДЭГи, кодирующие белки, связанные с глутатионом, в обоих симбионтах *L. pulmonaria* и белки, связанные с тиоредоксином, в микобионте. Регуляция генов, кодирующих классические ферменты, нейтрализующие АФК, например каталазы, также происходит в ответ на УФ-облучение в микобионте *L. pulmonaria*, что согласуется с увеличением активности каталазы в лишай-

нике *P. aphthosa* после УФ-облучения (Shelyakin *et al.*, 2021). В митохондриях и хлоропластах существует несколько альтернативных путей транспорта электронов, которые предотвращают образование АФК. Интересно, что УФ-индуцированное повышение активности SHAM-чувствительного альтернативного дыхательного пути у *L. pulmonaria* коррелирует с повышением уровня генов АОХ у обоих мико- и фотобионта. Таким образом, УФ-В повышает уровень генов, участвующих в предотвращении образования АФК и детоксикации АФК в обоих симбионтах *L. pulmonaria*.

В микобионте ДЭГи включали целый ряд генов, классически связанных со стрессовой устойчивостью, в том числе гены, участвующие в окислительно-восстановительном метаболизме, сворачивании белков, протеолизе и убиквитинировании. Двадцать ДЭГов, кодирующих шапероны, были стимулированы как при раннем (2-ой день УФ-облучения), так и при позднем (11-ый день УФ-облучения) УФ-стрессе. Наибольшие изменения среди ДЭГов, кодирующих шапероны, были обнаружены для гена BCS1, который кодирует митохондриальный шаперон. Этот ген входит в топ-20 существенно повышенных ДЭГов как при раннем, так и при позднем УФ-стрессе. Экспрессия генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами, кодирующие глутатион-зависимые белки, такие как Mss4-подобный белок, глутаредоксин, глутатион S-трансфераза и глутатион-редуктаза, а также две каталазы, была повышена только во время позднего УФ-стресса. Экспрессия генов, кодирующих белки митохондриальной электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), такие как АОХ, альтернативная NADH-дегидрогеназа, и гены, кодирующие шаперон биогенеза железо-серных кластеров из семейства белков теплового шока 70 (HSP70), также была повышена.

У фотобионта *S. reticulata* ДЭГи, связанные со стрессом, включали HSP, в частности HSP20, HSP70 и ClpB1, антиоксидантные ферменты, например, аскорбатпероксидазу и глутатион-зависимые белки, такие как глутатион-S-трансфераза и Mss4-подобный белок. Повышение экспрессии этих генов наблюдалось во 2-ой день УФ-облучения и продолжалось до 11-ого дня, что указывает на их участие как в ранних, так и поздних стрессовых реакциях. Среди генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами, гены, кодирующие АОХ, демонстрировали наибольшее увеличение экспрессии в фотобионте. Кроме того, гены, связанные с фотозащитными или фоточувствительными функциями, такие как пирин, криптохром и один ген, связанный с биосинтезом каротиноидов, были повышены в 7-ой и 11-ый дни УФ-облучения.

В данном исследовании впервые проанализировано влияние УФ-В на экспрессию генов в лишайниках. Морфологические изменения, вызван-

ные УФ-В, включают в себя пигментацию верхнего кортекса, и на основании транскриптомного анализа мы предполагаем, что это является следствием синтеза различных типов меланинов, таких как эумеланин и алломеланин. Наряду с этим, происходит регуляция генов, отвечающих за биосинтез некоторых других вторичных метаболитов, таких как нафталены, антрахиноны и ксантоны. Кроме того, УФ-В вызывает значительные изменения в транскрипции генов, участвующих в других защитных механизмах, таких как обезвреживание АФК, синтез и защита белков. В целом, наши данные свидетельствуют о том, что реакция *L. pulmonaria* на УФ-излучение регулируется сложным взаимодействием активности генов как грибного, так и водорослевого симбионтов.

Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН и поддержана грантом РФФИ № 23-14-00327.

Библиографические ссылки

1. Almer, J. Symbiont-specific responses to environmental cues in a threesome lichen symbiosis [Text] / J. Almer, P. Resl, H. Gudmundsson, D. Warshan, Ó.S. Andr sson, S. Werth // Molecular Ecology. – 2023. – V. 32. – P. 1045-1061.
2. Belozerskaya, T. A. Melanin pigments of fungi [Text] / T. A. Belozerskaya, N. N. Gessler, A. A. Aver'yanov // Fungal Metabolites. – 2017. – V.2017. – P. 263-291.
3. Carniel, F.C. New features of desiccation tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia gelatinosa* are revealed by a transcriptomic approach [Text] / F.C. Carniel, M. Gerdol, A. Montagner, E. Banchi, G. De Moro, C. Manfrin, L. Muggia, A. Pallavicini, M. Tretiach // Plant Molecular Biology. – 2016. – V. 91. – P. 319-339.
4. Chavarria-Pizarro, T. Gene expression responses to thermal shifts in the endangered lichen *Lobaria pulmonaria* [Text] / T. Chavarria-Pizarro, P. Resl, A. Janjic, S. Werth // Molecular Ecology. – 2021. – V.31. – P. 839-858.
5. Gauslaa, Y. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria* [Text] / Y. Gauslaa, K. A. Solhaug // Oecologia. – 2001. – V.126. – P. 462-471.
6. Geib, E. Cross-chemistry leads to product diversity from atromentin synthetases in *Aspergilli* from section *Nigri* [Text] / E. Geib, F. Baldeweg, M. Doerfer, M. Nett, M. Brock // Cell Chemical Biology. – 2019. – V.26. – P. 223-234.
7. Gill, S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [Text] / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiology and Biochemistry. – 2010. – V. 48. – P. 909-930.
8. Goga, M. Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential [Text] / M. Goga, J. Ele ko, M. Marcin inov , D. Ru ov , M. Ba kov , M. Ba kor // Co-evolution of Secondary Metabolites. – 2020. – P. 175-209.
9. Junttila, S. Whole transcriptome characterization of the effects of dehydration and rehydration on *Cladonia rangiferina*, the grey reindeer lichen [Text] / S. Junttila, A. Laiho, A. Gyenesi, S. Rudd // BMC genomics. – 2013. – V.14. – P. 1-14.
10. Mafole, T. C. Occurrence and possible roles of melanic pigments in lichenized ascomycetes [Text] / T. C. Mafole, K. A. Solhaug, F. V. Minibayeva, R. P. Beckett // Fungal Biology Reviews. – 2019. – V.33. – №. 3-4. – P. 159-165.

11. Matee, L.P. et al. Characterization and role of tyrosinases in the lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. [Text] / L.P. Matee, R.P. Beckett, K.A. Solhaug, F.V. Minibayeva // The Lichenologist. – 2016. – V. 48. – P. 311-322.
12. Mosunova, O.V. Evolution-informed discovery of the naphthalenone biosynthetic pathway in fungi [Text] / O.V. Mosunova, J.C. Navarro-Muñoz, D. Haksar, J. van Neer, J. Hoeksma, J. den Hertog, J. Collemare // mBio. – 2022. – P. e00223-22.
13. Nguyen, K. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners [Text] / K. Nguyen, M. Chollet-Krugler, N. Gouault, S. Tomasi // Natural Product Reports. – 2013. – V.30. – P. 1490-1508.
14. Robson, M.T. A perspective on ecologically relevant plant-UV research and its practical application [Text] / T. Matthew Robson, P.J. Aphalo, A.K. Banaś, P.W. Barnes, C.C. Brelsford, G.I. Jenkins, T.K. Kotilainen, J. Łabuz, J. Martínez-Abaigar, L.O. Morales, S. Neugart, M. Pieristè, N. Rai, F. Vandenbussche, M.A.K. Jansen // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2019. – V. 18. – P. 970-988.
15. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [Text] / P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessarakli // Journal of Botany. – 2012. – V. 2012. – P. 1-26.
16. Shelyakin, M.A. The effect of UV-B radiation on the antioxidant system in the *Peltigera aphthosa* and *Peltigera rufescens* lichens [Text] / M.A. Shelyakin, E.V. Silina, T.K. Golovko // Journal of Siberian Federal University. – Biology. – 2021. – V. 14. – P. 328-338.
17. Wu, Z.H. Antioxidant xanthenes and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. [Text] / Z.H., Wu, D., Liu, Y., Xu, J.L., Chen, W.H., Lin // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2018. – V.16. – P. 219-224.

Влияние внесения источника селена в состав питательной среды на антиоксидатные свойства каллусной культуры и культуры микрополюсов розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.)

Логвина А. О.^{А*}, Мухина А. А.^А

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

Метод культуры клеток и тканей растений находит широкое применение в современной биологии, играя значительную роль как в повышении эффективности классических путей селекции при создании новых сортов, получении свободных от вирусов популяций и сохранении редких видов растений, так и в современных способах получения ценных биологически активных веществ. Незаменим данный подход при генетическом улучшении и изучении процесса морфогенеза растений *in vitro* на всех уровнях организации. Культуры клеток и тканей активно используются в микроклональном размножении – одном из способов вегетативного размножения, результатом которого является получение растений, идентичных материнскому. Каллус представляет собой недифференцированную массу клеток, начинающую свой рост из культивируемой ткани. Данный