

Правительство Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный университет»  
(СПбГУ)

УДК 581.1:633/635  
Рег № НИОКТР  
АААА-А16-116040760024-7  
Инв.№ 34935747

УТВЕРЖДАЮ  
Начальник Управления  
научных исследований СПбГУ  
\_\_\_\_\_ Е.В. Лебедева  
« » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

ОТЧЁТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Механизмы формирования устойчивости семян *Pisum sativum* L. и *Brassica napus* L. к окислительному стрессу и гликиоокислительному повреждению белков при хранении (итоговый)

По гранту РФФИ  
№ 16-16-00026 от 18.01.2016

Руководитель НИР,  
профессор,  
доктор биологических наук



С.С. Медведев

Санкт-Петербург  
20\_\_

## ИТОГОВЫЙ ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТУ № 16-16-00026

### «Механизмы формирования устойчивости семян *Pisum sativum* L. и *Brassica napus* L. к окислительному стрессу и гликиоокислительному повреждению белков при хранении»

#### 5.2. Содержание фактически проделанной работы, полученные результаты (за все годы, не более 10 стр.)

##### Введение

Почти три четверти продуктов питания мы получаем из семян, поэтому получение семян высокого качества является основой пищевой безопасности страны. Посевные качества семян определяются совокупностью свойств, характеризующих степень их пригодности для посева и хранения. Пищевое качество семян определяется их пригодностью для питания человека и животных. Соответственно, качественные семена должны обладать способностью долгое время храниться без снижения функциональной активности и питательной ценности. Несмотря на то, что в сельскохозяйственном производстве условия хранения семян должны быть оптимизированы, в случае длительного хранения семена постепенно накапливают структурные и метаболические повреждения и, в конечном счете, теряют жизнеспособность. В основе повреждений, приводящих к ухудшению качества семян при хранении, лежат гликирование белков, перекисное окисление липидов, генерация активных форм кислорода и свободных радикалов. Настоящий проект был направлен на выявление механизмов формирования устойчивости семян *Pisum sativum* L. и *Brassica napus* L. к окислительному стрессу и гликиоокислительному повреждению белков при хранении. При выполнении проекта были изучены метаболические процессы, которые обеспечивают устойчивость семян гороха и рапса к продуктам гликирования белков, перекисному окислению липидов и активным формам кислорода. Устойчивость семян к окислению при хранении была оценена с использованием метода «ускоренного старения», позволяющего в краткие сроки моделировать повреждения, возникающие в семенах при длительном хранении. Впервые выявлены связи между такими биохимическими параметрами семян бобовых и масличных растений, как содержание хлорофиллов и степенью гликиоокислительного повреждения белков с одной стороны, и их всхожестью и влиянием на здоровье человека, с другой. Показано, что хлорофиллы, присутствующие в зрелых семенах, инициируют окислительные процессы и снижают сроки хранения семян. Для изучения этих механизмов был использован комплексный подход, основанный на проведении транскриптомного, протеомного и метаболомного анализа. Полученные результаты позволили выявить пептиды - продукты гликирования белков и метаболиты, которые могут служить маркерами качества семян рапса и гороха.

##### Основные результаты.

#### I. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СЕМЯН ГОРОХА *P. SATIVUM* С ЖЕЛТОЙ И ЗЕЛеноЙ ОКРАСКОЙ И РАПСА *B. NAPUS* В СВЯЗИ С ДЕГРАДАЦИЕЙ ХЛОРОФИЛЛОВ

##### 1.1. Изучение особенностей эмбриогенеза семян, изменений в структуре зародыша, эндосперма и семенной кожуры при созревании семян гороха и рапса.

###### *Pisum sativum* L.

У растений гороха сравнительный анализ эмбриогенеза был проведен в связи с особенностями формирования семян с желтыми и зелеными семядолями (сорта Frisson и Rondo, соответственно) (Рис.1-4, Отчет 2016). Анализ процессов развития структур семени и перикарпия на стадии сердечка и раннего U-образного зародыша показал, что начало появления зеленой окраски у зародышей сопряжено с деструкцией внутреннего интегумента, началом лизиса клеток внутренних слоев тегмена и содержимого клеток паренхимы перикарпия. Это приводит к увеличению светопроницаемости покровов и активации фотосинтеза зародыша. Структурных различий в процессах эмбриогенеза, формирования семени и перикарпия у сортов гороха, формирующих желтые и зеленые семена, не выявлено. Различия касались, главным образом, темпов формирования семян (более быстрого у семян с желтой окраской – около 40 дней, более медленного у семян с зеленой окраской – 50-60 дней), их размеров (почти в 2 раза больших у семян с зеленой окраской) и окраски зародыша к моменту созревания.

###### *Brassica napus* L.

Динамика развития и изменения окраски зародыша и семенной кожуры рапса анализировалась на 5 стадиях формирования семени (Рис.3.1 и 3.2, Отчет 2017). *Стадия 1*: все части семени имеют зеленую окраску, включая семенную кожуру, семядоли, почечку и зародышевый корешок, содержат хлорофиллы *a* и *b* и характеризуются высокой фотохимической активностью. Семядоли тонкие и не сомкнуты. Семенная кожура тонкая. *Стадия 2*: семядоли сохраняют интенсивную зеленую окраску и фотохимическую активность, однако зародышевый корешок начинал светлеть. Семенная кожура приобретала слегка коричневатый оттенок. Семядоли более плотные, сомкнуты. *Стадия 3*: Зародыш полностью сформирован. Семядоли светло-зеленые.

Кончик зародышевого корешка - белый, основание – светло-зеленое. Семенная кожура - зеленая с красно-коричневыми пятнами. Фотохимическая активность семядолей на этой стадии прекращалась на фоне постепенной деградации хлорофиллов и снижения содержания воды. *Стадия 4:* семенная кожура становится коричневой (с красноватыми участками), семядоли зародыша – желтовато-зеленоватыми, его корешок – бесцветным. После этого начинается быстрый процесс окончательного созревания семян (*Стадия 5*), когда хорошо выявляются различия в окраске семян с разным содержанием остаточных хлорофиллов. Преобладающая часть зрелых семян становится темно-коричневыми и лишены остаточных хлорофиллов. Зародыши красно-коричневых семян содержат остаточные хлорофиллы. Принципиальных различий в строении зародышей и семенной кожуры в семенах без остаточных хлорофиллов и с остаточными хлорофиллами не выявлено, за исключением определенной сглаженности поверхности тегмена и тесты семенной кожуры у семян с красновато-коричневой окраской (с остаточными хлорофиллами)

## **1.2. Ультроструктурный анализ пластид формирующихся семян гороха и рапса с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.**

### ***Pisum sativum* L.**

На ранней стадии созревания семян гороха (14-16 DAP, дней после опыления) семядоли обоих сортов гороха имели темно-зеленую окраску и характеризовались максимальной фотохимической активностью. Их пластиды имели развитую тилакоидную систему, состоящую из небольших гран (до 6-9 тилакоидов), межгранных тилакоидов и единичных крахмальных зерен (Рис.4.1 и 4.2, Отчет 2017).

На средней стадии созревания семян (18-21 DAP у сорта Frisson и 24-26 DAP у сорта Rondo) семядоли сохраняли зеленую окраску, однако их фотохимическая активность снижалась. В клетках всех слоев отмечалось увеличение размеров пластид и крахмальных зерен. В вакуолях происходило накопление белковых тел, менее выраженное у сорта Rondo, чем у сорта Frisson (Рис.4.3 и 4.4, Отчет 2017). При этом пластиды клеток субэпидермы и паренхимы трансформировались в амилопласты.

На поздней стадии созревания семян гороха (32 DAP у семян сорта Frisson и 35 DAP у семян сорта Rondo) семядоли сорта Frisson становились желтыми (проявлялась окраска каротиноидов на фоне разрушения хлорофиллов), а семядоли сорта Rondo оставались зелеными. Фотохимическая активность у обоих сортов на этой стадии прекращалась и сопровождалась обезвоживанием тканей. У большинства пластид наблюдались крупные крахмальные зерна, вдоль которых сохранялась лишь оболочка пластиды и тонкий слой остатков стромы (Рис.4.5 и 4.6, Отчет 2017). Отличительной характеристикой сорта Frisson, формирующего желтые семена, является накопление большого количества пластоглобул в клетках паренхимы и особенно субэпидермы семядолей. По мере сокращения объема тилакоидной системы и постепенного накопления крахмала, количество таких пластоглобул возрастало, и они собирались в плотные компактные группы. У сорта Rondo, формирующего зеленые семена, наблюдаются лишь мелкие единичные пластоглобулы. Хлорофиллы, отвечающие за зеленую окраску семядолей сорта Rondo, очевидно, очевидно локализируются в пластидах клеток субэпидермы и паренхимы, гранальная структура которых полностью не разрушается.

### ***Brassica napus* L.**

Строение пластид семядолей формирующихся семян рапса в клетках эпидермы, субэпидермы и паренхимы значительно различалось. На стадии 1 в эпидерме пластиды были более мелкие, содержали единичные крахмальные зерна и небольшое количество стромы (Рис. 2.1, Отчет 2018). Поверхность крахмальных зерен имела небольшие складки; в строме выявлялись тонкие тилакоиды. Субэпидермальные пластиды были более крупными с 1-3 крахмальными зернами и гранами, состоящими из 2-4 тилакоидов, между которыми находились несколько межгранных тилакоидов. В паренхиме пластиды имели сходную структуру; в их строме иногда наблюдались до 5-8 тилакоидов в гранах и периферический ретикулум. В цитоплазме клеток субэпидермы и паренхимы выявлялись мелкие круглые структуры (возможно, пластоглобулы), по-видимому, заполненными маслом. На стадии 2 в пластидах всех слоев клеток семядолей происходило постепенное исчезновение крахмальных зерен и гран с тилакоидами и появлялись кристаллоподобные образования (Рис. 2.2, Отчет 2018). Однако, в ряде пластид (как эпидермы, так и субэпидермы и паренхимы) крахмал сохранялся; в таких тилакоидах еще были заметны строма, остатки тилакоидов, а также хлопьевидное вещество, вероятно, образующееся в результате фрагментации электронно-плотных гранул поясков вокруг крахмальных зерен. На стадии 3 в пластидах исчезал крахмал, увеличивалось число и размеры кристаллоподобных образований (Рис. 2.3, Отчет 2018). Внутри последних появлялись электронно-плотные участки, а пространство, ранее заполненное крахмальными зернами, постепенно заполнялось хлопьевидным веществом. Тилакоиды и граны становились неразличимыми; вокруг пластид сохранялась лишь тонкая оболочка. В зрелых семенах в пластидах происходит практически полная деградация гран и тилакоидов, превращение крахмала в липиды и хлоропластов в пластиды, похожие на элайопласты (Рис. 2.1, Отчет 2018). Зрелые семена рапса обычно имеют желтые семядоли и темно-коричневую кожуру. Однако, иногда встречаются семена с зеленоватыми семядолями (и красно-коричневой кожурой), у которых хлорофиллы до конца не разрушаются. Установлено,

что структура пластид у таких семян существенно не различалась. В отличие от зеленых семян гороха, остатков тилакоидных мембран в зрелых семенах рапса с остаточными хлорофиллами не обнаружено.

### 1.3. Динамика фотохимических процессов и содержание фотосинтетических пигментов на разных этапах созревания семян гороха и рапса.

#### *Pisum sativum* L.

В семенах гороха фотосинтетические пигменты синтезируются на самых ранних стадиях эмбриогенеза и присутствуют как в зародышах, так и в семенной кожуре (Рис. 7, Отчет 2016). У растений, формирующих семена с желтой окраской, в процессе эмбриогенеза содержание хлорофиллов в зародышах постепенно снижалось до практически полного их разрушения в конце созревания. У растений, формирующих семена с зеленой окраской, содержание хлорофиллов поддерживалось на одном уровне в течение всего эмбриогенеза, однако на поздних стадиях созревания происходило разрушение хлорофиллов в центре семядолей, при этом на периферии семядолей зеленая окраска сохранялась. Активность фотохимических процессов была изучена методом РАМ-флуориметрии, основанной на импульсной амплитудной модуляции, с использованием Walz PAM-2500 (Heinz Walz GmbH, Germany). Фотохимические процессы регистрировались как в семенной кожуре, так и в семядолях гороха (Рис. 8, Отчет 2016). У растений, формирующих семена, как с желтой, так и зеленой окраской, фотосинтез начинал функционировать на самых ранних стадиях эмбриогенеза и прекращался на стадии созревания семян. Прекращение фотосинтеза было сопряжено со снижением влагосодержания тканей. Вероятно, именно обезвоживание, а не разрушение хлорофиллов является триггером прекращения фотосинтеза при созревании семян.

#### *Brassica napus* L.

В семенах рапса фотосинтетические пигменты также синтезировались на самых ранних стадиях эмбриогенеза и присутствовали в зародышах и семенной кожуре. В процессе эмбриогенеза содержание хлорофиллов (Хл) в семенах постепенно снижалось до практически полного их разрушения (Рис. 2.1, Отчет 2017). При этом Хл *b* разрушались быстрее, чем Хл *a* (отношение Хл *a/b* увеличивалось от 2.1 на ранней стадии созревания семян до 3.5 в зрелых семенах), суммарное содержание хлорофиллов снижалось быстрее, чем суммарное содержание каротиноидов (Кар) (отношение Кар/Хл увеличивалось с 0.1 на ранней стадии созревания семян до 2.0 в зрелых семенах). На поздних этапах созревания наблюдалась высокая матричная разнокачественность семян в пределах соцветия вследствие разных сроков образования завязи и разной обеспеченности формирующихся семян элементами питания. В зрелых семенах рапса наблюдалась вариабельность по содержанию хлорофиллов в семядолях, которая была сопряжена с цветом семенной кожуры. Семена с красно-коричневой кожурой содержали больше остаточных (не полностью разрушенных) хлорофиллов, чем семена с темно-коричневой кожурой (Рис. 2.2, Отчет 2017). Эта вариабельность, однако, не была связана с особенностями фотосинтетических процессов в семенах. Оценка активности фотохимических процессов в семенной кожуре и семядолях рапса при помощи РАМ-флуориметрии (с использованием MINI-PAM-II В (Heinz Walz GmbH, Germany) показала, что фотосинтез начинал функционировать в семенах рапса на самых ранних стадиях эмбриогенеза и прекращался на средней стадии созревания (Рис. 2.3-2.5, Отчет 2017). Прекращение фотосинтеза в семенной кожуре было сопряжено с деструктивными процессами в клетках, сопровождающимися изменением структуры клеток и лизисом клеточного содержимого. Прекращение фотосинтеза в семядолях, как и у гороха, было сопряжено со снижением содержания воды.

### 1.4. Выявление генов, экспрессия которых дифференциально изменяется в процессе формирования семян гороха и рапса.

#### *Pisum sativum* L.

Сравнительный анализ транскриптомов семян гороха *P. sativum* сортов Frisson и Rondo с помощью высокопроизводительного секвенирования на геномном секвенаторе Illumina HiSeq2000 позволил выявить ряд генов, экспрессия которых дифференциально меняется в процессе формирования желтых и зеленых семян: *SDR* (кодирует короткоцепочечную дегидрогеназу/редуктазу – фермент синтеза АБК); *ABAR* (кодирует рецептор АБК); *GAR* (кодирует рецептор гиббереллина); *CBP* (кодирует хлорофилл *a/b*-связывающий белок); *TXN* (кодирует тиоредоксин); *LEA* (кодирует белок позднего эмбриогенеза). Была также выявлена экспрессия генов, кодирующих ферменты, принимающие участие в катаболизме хлорофиллов: *NYC1* (chlorophyll *b* reductase); *HCAR* (7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase); *MgCh* (magnesium-dechelataase); *PPH* (pheophytin pheophorbide hydrolase, pheophytinase); *PAO* (pheophorbide *a* oxygenase); *RCCR* (red chlorophyll catabolite reductase), а также *ABI3* – АБК-зависимый фактор транскрипции, который является наиболее подходящим кандидатом на роль регулятора активности генов *Stay Green* (*SGR*), поскольку именно он контролирует завершающие этапы созревания семян: обезвоживание, потерю хлорофилла и переход в состояние покоя.

Анализ экспрессии выбранных генов, отвечающих за регуляцию эмбриогенеза в семенах гороха методом ОТ-ПЦР, показал, что на ранней стадии созревания семени (16 DAP) экспрессия генов *GAR*, *LEA*, *SDR* и *TXN* была ниже в семенах сорта Frisson, чем в семенах гороха сорта Rondo (Рис. 8.1 и 8.2, Отчет 2017). На более позднем

этапе эмбриогенеза (21 DAP) в семенах гороха Frisson наблюдалась более высокая экспрессия генов, кодирующих рецептор (*ABAR*) и ключевой фермент синтеза (*SDR*) АБК. С другой стороны, в семенах Frisson была более высокая экспрессия генов, которые кодируют ферменты деградации хлорофиллов. Наибольшая разница наблюдалась в экспрессии гена *PAO*, кодирующего феофорбид *a* оксигеназу. Интересно то, что экспрессия генов, отвечающих за деградацию хлорофиллов, проявлялась на ранней стадии созревания семян (16 DAP), когда различия по содержанию хлорофиллов и фотохимической активности в семядолях еще не проявлялись. При этом на более поздней стадии созревания (21 DAP), характеризующейся снижением содержания хлорофиллов и фотохимической активности, различия в экспрессии генов у сортов нивелировались. Это может быть связано с тем, что на стадии 16 DAP деградация хлорофиллов происходила только у сорта Frisson, формирующего желтые семядоли, а на стадии 21 DAP этот процесс начинался и у сорта Rondo, формирующего зеленые семядоли.

### ***Brassica napus* L.**

Секвенирование библиотек кДНК семян рапса проведено на первых трех стадиях созревания (описание стадий дано выше, раздел 1.1.) с использованием геномного секвенатора Illumina HiSeq 2500. Сравнительный биоинформационный анализ транскриптомов позволил выявить около 350 генов, экспрессия которых дифференциально менялась (в 2 и более раз) на разных на разных этапах эмбриогенеза. Максимальная представленность транскриптов (от 34000 до 5000) наблюдалась для генов, кодирующих напин-, круциферин- и олеозин-подобные белки. Их содержание снижалось по мере созревания семян (от 100 и более раз). При этом значительно накапливались также транскрипты генов, которые отвечали за синтез белков позднего эмбриогенеза. Поскольку нас интересовали гены, ответственные за процесс деградации хлорофиллов, для анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР, были выбраны генов 7 генов, которые кодируют ферменты катаболизма хлорофиллов (*LHCII*, *NYC1*, *HCAR*, *MgD*, *PPH*, *PAO* и *RCCR*). Наиболее высокая экспрессия большинства генов наблюдалась на стадии 1, когда семядоли рапса еще имели интенсивную зеленую окраску и фотохимически активны (Рис. 5.4, Отчет 2018). Однако далее, в процессе созревания семян, динамика экспрессии генов, кодирующих ферменты деградации хлорофиллов, различалась. Экспрессия *LHCII*, *NYC1*, *HCAR*, *PAO* и *RCCR* резко снижалась на стадии 2. Т.е. все ферменты, которые они кодируют, по-видимому, синтезируются на самых ранних этапах эмбриогенеза и далее участвуют на соответствующих этапах деградации хлорофиллов. Совсем другая динамика экспрессии наблюдалась для генов *MgD*, (кодирует Mg-дехелатазу) и *PPH* (кодирует феофитиназу). Их экспрессия изначально (на стадии 1) была в полтора-два раза ниже по сравнению с другими исследованными генами и на последующих стадиях эмбриогенеза она менялась незначительно.

## **II. АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ЗРЕЛЫХ СЕМЯН ГОРОХА *P. SATIVUM* С ЖЕЛТОЙ И ЗЕЛЕННОЙ ОКРАСКОЙ И РАПСА *B. NAPUS* К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ ПРИ ХРАНЕНИИ**

### **2.1. Сравнительный метаболомный анализ семян, всхожесть которых была снижена под влиянием ускоренного старения или в процессе длительного хранения.**

#### ***Pisum sativum* L.**

Оценка устойчивости зрелых семян гороха к неблагоприятным условиям хранения была проведена при помощи метода ускоренного старения (УС). В нашей работе зрелые семена гороха с желтыми семядолями (сорт Миллениум) и зелеными семядолями (сорт Глориоза) инкубировали в эксикаторе при 45°C и 86%-ной влажности воздуха в течение 3 и 5 суток. Установлено, что зеленые семена гороха были менее устойчивы к неблагоприятным условиям хранения: после УС они в более высокой степени снижали всхожесть, скорость прорастания и формировали большее количество ненормально развитых проростков (Рис. 9 и Рис. 10, Отчет 2016). Механизмы повреждения зеленых семян были связаны в первую очередь с повреждением целостности клеточных мембран, что подтверждают данные кондуктометрического теста (Рис. 11, Отчет 2016). Были проанализированы также уровень пероксида водорода и малонового диальдегида (МДА), а также содержание восстановленной и окисленной форм аскорбата (Аск/Д-аск) (Рис. 12 и Рис. 13, Отчет 2016). В зеленых семенах гороха уровень МДА и пероксида водорода был в 2-4 раза выше, чем в желтых семенах. В условиях УС содержание пероксида водорода в зеленых семенах вначале возрастало (через 3 суток), а затем (через 5 суток) снижалось почти до исходного уровня. Уровень МДА в зеленых семенах гороха под действием условий УС снижался. Содержание общего аскорбата и его окисленной формы в зеленых и желтых семенах гороха совпадало, тогда как уровень восстановленного аскорбата был в 2,5 раза выше в семенах с желтой окраской. Следует также отметить, что УС повышало у зеленых семян гороха соотношение Аск/Д-аск.

При помощи газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), выполнен анализ экстрактов, выделенных из полярной водно-спиртовой фракции семян. Идентификацию и количественный анализ метаболитов проводили в программах AMDIS, NIST MSSEARCH, Xcalibur и LCquan с привлечением базы данных GMD (Golm Metabolome Database). Обработку первичных данных, иерархический кластерный анализ и кластеризацию - методом главных компонент (МПК) и методом дискриминантного анализа проекций на латентные структуры - в программе Metaboanalyst. Всего было идентифицировано 45 низкомолекулярных

метаболитов (в основном, аминокислоты, органические кислоты и сахара). Полученная МГК модель продемонстрировала существенные биохимические различия между зародышами желтых и зеленых семян гороха, которые усиливались после УС (Рис. 3.4, Отчет 2018). Показано, что наиболее высокую значимость ( $VIP > 1.0$ ) имели раффиноза, сахароза, галактинол, лимонная кислота и фосфорная кислота (Рис. 3.6, Отчет 2018). Содержание всех этих веществ было выше в желтых семенах, чем в зеленых (Рис. 3.5, Отчет 2018). При этом в условиях УС их содержание снижалось в обоих вариантах. Снижение содержания сахарозы и раффинозы можно предложить, как маркеры оценки качества семян гороха при хранении.

### ***Brassica napus* L.**

Проведен сравнительный анализ биохимических изменений в зрелых семенах рапса при длительном хранении (несколько лет при 18°C и 5%-ном влагосодержании) и ускоренном старении (УС, несколько суток при 40°C и 10%-ном влагосодержании). Контролем являлись семена, которые хранились 2 года, со всхожестью 99%. Через 4 года хранения и 1 сутки УС всхожесть семян снижалась до 91%. Через 9 лет хранения и 7 суток УС всхожесть семян снижалась до 46% (Рис. 5.1 и 5.2, Отчет 2017). Механизмы повреждения семян рапса при хранении также были связаны с повреждением целостности клеточных мембран (кондуктометрический тест): при этом УС приводило к большей степени повреждения мембран, чем длительное хранение (Рис. 5.3, Отчет 2017). Интересно, что семена рапса с красно-коричневой кожурой, которые содержали больше остаточных (не полностью разрушенных) хлорофиллов, были более чувствительны к УС, чем семена с темно-коричневой кожурой (Табл. 5.5 и Рис. 5.1, Отчет 2017). Естественное старение семян при длительном хранении не влияло на соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона (Рис. 5.4, Отчет 2017). Однако всего 1 сутки инкубации семян в условиях УС приводили к резкому повышению уровня окисленного глутатиона и снижению содержания его восстановленной формы. Это может являться следствием повышения влагосодержания семян и активации ферментативных систем антиоксидантной защиты в ответ на стресс. Анализ полярной водно-спиртовой и неполярной гексановой фракций экстрактов семян рапса ГХ-МС выявил разные профили метаболитов у семян, всхожесть которых была снижена в процессе естественного и искусственного старения (Рис. 7.1, Отчет 2017 и Рис. 3.1, Отчет 2018). При длительном хранении в семенах увеличивалось содержание яблочной кислоты, рибитола, маннитола (Табл. 7.1, Отчет 2017). Также повышалось содержание эруковой, элаидиновой, линолевой, олеиновой, арахидоновой, миристиновой, стеариновой и бегеновой кислот (Рис. 3.2 и Рис. 3.3, Отчет 2018). При этом снижалось содержание альфа- и гамма-токоферолов, кампестерола, бета-ситостерола, стеариновой и пальмитолеиновой кислот. После УС увеличивалось содержание арабинитола, галактозы, сорбозы, глюкозы, фруктозы, сорбитола. При этом снижалось содержание сахарозы, раффинозы, рибитола, маннитола, а также (незначительно) альфа- и гамма-токоферолов. Таким образом, между семенами, старение которых происходило при длительном хранении и ускоренном старении, существуют значительные биохимические различия, что, по-видимому, связано с разной влажностью и температурой инкубации семян. В качестве маркеров снижения качества семян рапса при длительном хранении можно выделить альфа- и гамма-токоферолы, кампестерол и бета-ситостерол. Также интересен эффект накопления ненасыщенных жирных кислот: эруковой, олеиновой и линоленовой.

### **2.2. Сравнительный протеомный анализ семян, всхожесть которых была снижена под влиянием ускоренного старения или в процессе длительного хранения.**

Протеомные стратегии, условно, делят на два типа: (I) *top-down* протеомика, в основе которой лежит изучение интактных белков из биологических образцов, с использованием классических методов разделения, таких как двумерный гель электрофорез и (II) *bottom-up* протеомика, которая основана на том, что белки вначале протеолитически расщепляют на пептиды, затем разделяют с помощью жидкостной хроматографии, ионизируют и вводят в масс-спектрометр. В нашей работе для анализа семян использовали *bottom-up* подход протеомики. Полученные смеси триптических пептидов были проанализированы с помощью нанопоточной обратнофазной хромато-масс-спектрометрии с онлайн детекцией с помощью Q Exactive Orbitrap-MS в режиме результат-обусловленного сбора данных (англ. data-dependent acquisition, DDA). Количественный анализ протеома семян основывался на обработке данных с помощью программного обеспечения Proteogen QIP.

### ***Pisum sativum* L.**

Проведен сравнительный протеомный анализ зародышей зрелых семян гороха *P. sativum* с желтой окраской семядолей (сорт Миллениум) и зеленой окраской семядолей (сорт Глориоза) (описание объектов см. в разделе 2.1). Для анализа были использованы физиологически зрелые семена с высокой всхожестью (контроль), а также семена, подвергнутые ускоренному старению (УС) в течение 3 и 5 суток. Содержание белка в зародышах желтых и зеленых семян существенно не отличалось и составляло примерно 65 мг/г сыр.веса. У зародышей с желтыми семядолями было идентифицировано 97 значимо различающихся белков, среди которых 95 были распределены по шести основным кластерам в соответствии с изменением количественного содержания соответствующих пептидов при ускоренном старении (Рис. 1.1 и 1.2, Отчет 2017). У зародышей с зелеными семядолями было идентифицировано 24 значимо различающихся белка, среди которых 22 белка удалось разделить на 6 кластеров и ещё 2 белка были отнесены к отдельной группе. Был также идентифицирован хлорофилл *a-b* связывающий белок (chlorophyll *a-b* binding protein, chloroplastic),

представленный исключительно в зелёных семенах. Среди идентифицированных белков, 17 дифференциально экспрессировались как в желтых, так и в зеленых семенах. Более тщательный анализ этих различий путем обработки данных в базах данных KEGG и String выявил их возможную связь с более высоким метаболическим статусом и снижением продолжительности жизни зеленых зародышей.

### ***Brassica napus* L.**

Объектом исследования служили семена ярового рапса *B. napus* L. сорта Оредеж-2. Семена были собраны в 2015 (2 года хранения), 2013 (4 года хранения) и 2008 гг. (9 лет хранения) и хранились при 18°C. Длительное хранение семян осуществляли открытым способом в сухом прохладном темном помещении при +18°C. Влагосодержание семян при этом было равно 5%. Ускоренное старение семян (УС) проводили путем их кратковременной инкубации при повышенных температуре и влажности воздуха. Контролем являлись семена, которые хранились 2 года, со всхожестью 99%. Через 4 года хранения и 1 сутки УС всхожесть семян снижалась до 91%. Через 9 лет хранения и 7 суток УС всхожесть семян снижалась до 46%.

УС инициировало изменение (увеличивало или уменьшало в 1.5 раза и более) содержание 63 белков, которые были распределены по шести основным кластерам (Рис. 1.1 А и В, Отчет 2018). После 1 суток УС изменения были незначительные: содержание 4-х белков повышалось в 2 и более раз и 3-х белков снижались в 1.5-2 раза. После 7 суток УС содержание 12 белков возрастало в 1.5-4 раза (ферритин, напин, криптохром 1, пектинэстераза, стеролеозин, альфа-субъединица 26S протеосомы, хроматин-ремоделирующий белок и др.). При этом содержание 25 белков снижалось (в 1.5-3 раза). Среди белков, содержание которых снижалось, следует особо отметить белки, которые отвечают за адаптацию семян к стрессорам: белки теплового шока БТШ 70, Cu/Zn-супероксиддисмутаза, белок ERD (early-responsive to dehydration stress), а также белки, которые участвуют в репарации поврежденных ДНК и белков: DNA mismatch repair protein MSH3 и Rad23 UV excision repair protein.

Длительное хранение семян рапса в течение 4 и 9 лет инициировало изменение содержания 96 белков (Рис. 1.1 Б и Г, Отчет 2018). После 4-х лет хранения было выявлено повышение уровня 9-х белков (от 1.5 до 6 раз) и снижение содержания 22-х белков (от 1.5 до 20 раз). После 9 лет хранения в 2 и более раз возрастало содержание 9 белков: альфа субъединицы 20S протеасомы, альдолазы (в 18 раз), бета-глюкозидазы, дегидрогеназы синапового альдегида, криптохрома 1 и др. При этом через 9 лет хранения снижалось содержание 25 белков, среди которых следует особо отметить те, которые отвечают за адаптацию семян к стрессорам: белки теплового шока БТШ 70 (в 12 раз), LEA-белки (в 20 раз), тиоредоксин (в 3 раза), а также запасной белок круциферин (в 31-124 раза!!), мирозиназу (в 27 раз) и цитокератин 1 (в 21 раз).

### **2.3. Идентификация гликированных белков и сайтов модификации в них. Выявление гликированных триптических пептидов, которые могут являться маркерами снижения качества семян бобовых культур при хранении. Оценка уровня гликирования семян при неблагоприятных условиях хранения с помощью аминокислотного анализа.**

В основу аналитической стратегии оптимизации методики определения гликированных аминокислот в семенах был положен подход Гломба и сотр. (Smuda et al., 2015), основанный на глубоком ферментативном гидролизе белков. В данной работе впервые достигнуто полное растворение и гидролиз мембранных белков, выделенных методом фенольной экстракции (Рис. 16, Отчет 2016). Показана совместимость процедуры гидролиза тотального препарата растительного белка с клеточными технологиями и получен профиль энзиматических гидролизатов (Рис. 17, Отчет 2016). Для анализа модифицированных аминокислот, полученные гидролизаты проанализированы с помощью ультра-высокоэффективной обратнофазной хромато-масс-спектрометрии (UHPLC Dionex 3000 с детекцией онлайн с помощью гибридного масс-спектрометра Orbitrap Elite). Дериватизированные конечные продукты глубокого гликирования (КПГ) были детектированы в хроматограммах тотального ионного тока (ТИС) и индивидуальных КПГ-специфических масс-хроматограммах. В семенах рапса после УС были детектированы такие КПГ как карбоксиметиллизин, гидроимидазолон (образованный метилглиоксалем) и аргпиримидин (Рис. 5.6., Отчет 2017). Была также отработана методика абсолютного количественного анализа образованный метилглиоксалем гидроимидозолонов. После УС наблюдалась тенденция к накоплению этих продуктов (Рис. 5.7, Отчет 2017).

## **III. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ ПИЩЕВОГО КАЧЕСТВА СЕМЯН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ СЕМЯН ГОРОХА**

### **3.1. Анализ про-воспалительного эффекта белков, выделенных из семян гороха разного качества, с использованием культуры клеток нейробластомы человека.**

Несмотря на наличие литературных данных, указывающих на про-воспалительные эффекты продуктов гликирования, вопрос влияния гликированных растительных белков на функциональное состояние животной клетки остаётся открытым. Поэтому важной задачей исследования являлась разработка модели, позволяющей провести оценку провоспалительного эффекта гидролизатов белков, выделенных из семян, в культуре клеток

человека. В качестве источника растительных гликированных белков были использованы семена гороха *Pisum sativum* L. с желтыми и зелеными семядолями. При этом были протестированы гидролизаты белков, выделенные как из семян, подвергнутых процедуре ускоренного старения (УС), так и из соответствующих контрольных вариантов. Проведение оценки провоспалительного действия осуществлялось на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y, позволяющей смоделировать индуцированное липополисахаридом (ЛПС) воспаление более успешно, нежели макрофагальная культура (Рис.6.1-6.3, Отчет 2017). В качестве маркеров воспалительного ответа были выбраны участники NF-κB-опосредованного сигналинга (белки c-Мус, FADD (Ser194), IκBα (Ser32), IKKα/β (Ser177/Ser181), NF-κB (Ser536), TNFR1). Было показано, что только в клетках, обработанных гидролизатом белка желтых семян гороха контрольной группы, есть статистически достоверная разница при сравнении с отрицательным контролем в отношении FADD, IκB и IKKα/β. Провоспалительное действие гидролизата белка желтых семян гороха контрольной группы, наблюдаемое в культуре клеток нейробластомы, сопоставимо с эффектом, вызываемым в клетках при помощи ЛПС. Также важно отметить, что не было выявлено выраженного провоспалительного действия гидролизатов белков семян гороха, подвергнутых УС по сравнению с белками контроля.

#### **Все планируемые работы выполнены полностью:**

Да

#### **5.3. Основные результаты выполнения проекта (не более 10 стр.)**

1. Сравнительный анализ эмбриогенеза растений гороха, формирующих семена с желтыми и зелеными семядолями (сорта Frisson и Rondo, соответственно) показал, что на начальных этапах эмбриогенеза перикарп, семенная кожура и зародыш имели зеленую окраску. В процессе формирования зародышей наблюдалась деструкция внутреннего интегумента, начало лизиса клеток внутренних слоев тегмена и содержимого клеток паренхимы перикарпия. Это приводило к увеличению светопрозрачности покровов и активации фотохимических процессов в зародыше. Структурных различий в процессах эмбриогенеза, формирования семени и перикарпия у сортов гороха, формирующих желтые и зеленые семена, не выявлено. Различия проявились только в темпах формирования семян (желтые семена формировались быстрее, чем зеленые) и их размеров (зеленые семена были почти 2 раза больше).

2. На ранних стадиях эмбриогенеза растений рапса (сорт Оредеж-2) перикарп, семенная кожура и зародыш также имели интенсивную зеленую окраску. Однако, на средней стадии созревания, когда зародыш был уже морфологически сформирован, зеленая окраска начинала исчезать. В семенной кожуре наблюдался лизис содержимого клеток, и она постепенно приобретала коричневый цвет. На поздних этапах созревания семян рапса наблюдалась высокая вариабельность по содержанию хлорофиллов в семядолях. Семена рапса с красно-коричневой кожурой содержали больше неразрушенных хлорофиллов, чем семена с темно-коричневой кожурой. Принципиальных различий в строении зародышей и семенной кожуры между ними не было выявлено, за исключением некоторой сглаженности поверхности тегмена и тесты семенной кожуры у семян с красновато-коричневой окраской.

3. Проведен ультраструктурный анализ пластид формирующихся семян гороха и рапса с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. У гороха на ранних стадиях эмбриогенеза пластиды имели развитую тилакоидную систему, состоящую из небольших гран, межгранных тилакоидов и единичных крахмальных зерен. На средней стадии отмечалось увеличение размеров пластид и крахмальных зерен. На поздней стадии у большинства пластид наблюдались крупные крахмальные зерна, вдоль которых сохранялась лишь оболочка пластины и тонкий слой остатков стромы. Отличительной характеристикой сорта, формирующего желтые семена, являлось накопление большого количества пластоглобул в клетках семядолей. У сорта, формирующего зеленые семена, наблюдались лишь мелкие единичные пластоглобулы. По сравнению с горохом, семена рапса отличались тем, что на средней стадии созревания, наряду с исчезновением гран с тилакоидами, наблюдалось постепенное исчезновение крахмальных зерен и накопление липидов в форме липидных капель. Структура пластид у зрелых семян с красно-коричневой и темно-коричневой кожурой существенно не различалась. Остатков тилакоидных мембран в зрелых семенах рапса с красно-коричневой (и остаточными хлорофиллами) не было обнаружено.

4. В семенах гороха и рапса фотосинтетические пигменты синтезировались на самых ранних стадиях эмбриогенеза и присутствовали в зародышах и семенной кожуре. Далее в процессе формирования семян рапса и гороха с желтыми семядолями содержание хлорофиллов (Хл) в зародышах постепенно снижалось до практически полного их разрушения в зрелых семенах. При этом Хл b разрушались быстрее, чем Хл a. У растений гороха, формирующих семена с зелеными семядолями, содержание хлорофиллов поддерживалось на одном уровне в течение всего эмбриогенеза, однако на поздних стадиях созревания в центре семядолей они разрушались, а на периферии сохранялись. У растений рапса в зрелых семенах наблюдалась высокая вариабельность по содержанию хлорофиллов в семядолях. Семена рапса с красно-коричневой кожурой содержали не полностью разрушенные хлорофиллы и имели зеленоватый цвет. У семян рапса с темно-коричневой кожурой хлорофиллы в семядолях не регистрировались и семядоли имели желтый цвет. Желтый

цвет семядолей гороха и рапса был обусловлен присутствием каротиноидов, которые при созревании семян не разрушались и локализовались, по-видимому, в пластоглобулах.

5. Фотохимические процессы, регистрируемые методом РАМ-флуориметрии, основанной на импульсной амплитудной модуляции, выявлялись в семядолях и семенной кожуре гороха и рапса на самых ранних стадиях эмбриогенеза и прекращались на средней стадии созревания семян. Прекращение фотосинтеза было сопряжено с началом обезвоживания тканей. Вероятно, именно обезвоживание, а не разрушение хлорофиллов является триггером прекращения фотосинтеза при созревании семян.

6. Сравнительный анализ транскриптомов зародышей гороха сортов Frisson (желтые семена) и Rondo (зеленые семена) позволил выявить ряд генов, экспрессия которых дифференциально меняется в процессе формирования желтых и зеленых семян: *SDR, ABAR, GAR, CBP, TXN, LEA*. При помощи метода ОТ-ПЦР была выявлена экспрессия генов, кодирующих ферменты, принимающих участие в катаболизме хлорофиллов. Несмотря на то, что на ранней стадии созревания семена гороха обоих сортов имели интенсивно зеленую окраску, экспрессия этих генов была выше у семян сорта Frisson, формирующих семядоли с желтой окраской. Однако на более поздней стадии экспрессия генов *HCAR, MgD, PAO* и *RCCR* у сорта Rondo увеличивалась и не отличалась от сорта Frisson. При этом экспрессия *NYC1* и *PPH* оставалась низкой. У семян рапса экспрессия генов *LHCII, NYC1, HCAR, PAO* и *RCCR* резко снижалась при переходе от ранней к средней стадии созревания. Экспрессия *MgD* и *PPH* была в 1.5-2 раза ниже по сравнению с другими генами, но не изменялась при созревании семян. Экспрессия *MgD* и *PPH* была практически в 2 раза ниже в семенах рапса с красно-коричневой кожурой и неполностью разрушившимися хлорофиллами.

7. Оценка устойчивости зрелых семян гороха к неблагоприятным условиям хранения была проведена при помощи метода ускоренного старения (УС). Для этого зрелые семена гороха с желтыми семядолями (сорт Миллениум) и зелеными семядолями (сорт Глориза) инкубировали в эксикаторе при 45°C и 86%-ной влажности воздуха в течение 3 и 5 суток. Показано, что зеленые семена гороха были менее устойчивы к УС, чем желтые. Они в более высокой степени снижали всхожесть, скорость прорастания и формировали большее количество ненормально развитых проростков. Механизмы повреждения зеленых семян были связаны в первую очередь с повреждением целостности клеточных мембран, что подтверждают данные кондуктометрического теста. Показано, что в зеленых семенах гороха проницаемость клеточных мембран, уровень малонового диальдегида и пероксида водорода был в 2-4 раза выше, чем в желтых семенах. Содержание общего аскорбата и его окисленной формы в зеленых и желтых семенах гороха совпадало, тогда как уровень восстановленного аскорбата был в 2,5 раза выше в семенах с желтой окраской. Следует также отметить, что УС повышало у зеленых семян гороха соотношение Аск/Д-аск.

8. Анализ профилей первичных метаболитов продемонстрировал существенные биохимические различия между зародышами желтых и зеленых семян гороха, которые усиливались после УС. Показано, что наиболее высокую значимость ( $VIP > 1.0$ ) имели раффиноза, сахароза, галактинол, лимонная кислота и фосфорная кислота. Содержание всех этих веществ было выше в желтых семенах, чем в зеленых. При этом в условиях УС их содержание снижалось в обоих вариантах. Снижение содержания сахарозы и раффинозы можно предложить, как маркеры качества семян гороха.

9. Проведен протеомный анализ зародышей зрелых семян гороха, всхожесть которых была снижена под влиянием ускоренного старения. Среди идентифицированных белков 17 дифференциально экспрессировались в желтых и зеленых семенах. У зародышей с желтыми семядолями идентифицировано 97 значимо различающихся белков, среди которых 95 были распределены по шести основным кластерам в соответствии с изменением количественного содержания соответствующих пептидов при ускоренном старении. У зародышей с зелеными семядолями было идентифицировано 24 значимо количественно отличающихся белка, среди которых 22 белка удалось разделить на 6 кластеров и ещё 2 белка были отнесены к отдельной группе. Был также идентифицирован белок, представленный исключительно в зеленых семенах (chlorophyll *a-b* binding protein).

10. Проведен сравнительный анализ биохимических изменений в зрелых семенах рапса после УС и длительного хранения. Контролем являлись семена со всхожестью 99%. Через 4 года хранения или 1 суток УС всхожесть семян снижалась до 91%. Через 9 лет хранения или 7 суток УС всхожесть семян снижалась до 46%. Механизмы повреждения семян рапса также были связаны с повреждением целостности клеточных мембран: при этом УС приводило к большей степени повреждения мембран, чем длительное хранение. Интересно, что семена рапса с красно-коричневой кожурой, которые содержали больше остаточных (не полностью разрушенных) хлорофиллов, были более чувствительны к УС, чем семена с темно-коричневой кожурой. Показано, что длительное хранение семян не влияло на соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона. Однако всего 1 сутки инкубации семян в условиях УС приводили к резкому повышению уровня окисленного глутатиона и снижению содержания его восстановленной формы.

11. Анализ метаболитных профилей семян рапса показал, что между семенами, старение которых происходило в условиях УС и длительного хранения, существуют значительные биохимические различия, что, по-видимому, связано с различной влажностью и температурой инкубации семян. При длительном хранении в семенах увеличивалось содержание яблочной кислоты, рибитола, маннитола, эруковой, элаидиновой, линолевой, олеиновой, арахидоновой, миристиновой, стеариновой и бегеновой кислот. При этом снижалось содержание альфа- и гамма-токоферолов, кампестерола, бета-ситостерола, стеариновой и пальмитолеиновой

кислот. После УС увеличивалось содержание арабинитола, галактозы, сорбозы, глюкозы, фруктозы, сорбитола. При этом снижалось содержание сахарозы, раффинозы, рибитола, маннитола, а также (незначительно) альфа- и гамма-токоферолов. В качестве маркеров снижения качества семян рапса при длительном хранении можно выделить альфа- и гамма-токоферолы, кампестерол и бета-ситостерол. Также интересен эффект накопления ненасыщенных жирных кислот: эруковой, олеиновой и линоленовой.

12. Протеомный анализ семян рапса после ускоренного старения (УС) и длительного хранения продемонстрировал, что УС инициировало изменение (увеличение или уменьшение) содержания 63 белков по сравнению с контролем, а у семян после длительного хранения значимо различалось содержание 96 белков, которые были распределены по 6 основным кластерам. Наиболее значительные изменения белковых спектров наблюдались после 7 суток УС и 9 лет хранения. Следует особо отметить, что в обоих вариантах старение снижало содержание белков, которые отвечают за адаптацию семян к стрессорам: белков теплового шока БТШ-70, LEA-белков, тиоредоксина, Cu/Zn-супероксиддисмутазы, белков ERD (early-responsive to dehydration stress), а также белков, участвующих в репарации поврежденных белков и ДНК: DNA mismatch repair proteins MSH3 и Rad23 UV excision repair proteins.

13. С целью выявления гликированных триптических пептидов, которые могут являться маркерами снижения качества семян при хранении, была оптимизирована методика, основанная на глубоком ферментативном анализе белков. Полученные гидролизаты анализировали с помощью ультравысокоэффективной обратнофазной хромато-масс-спектрометрии. В семенах рапса после УС были детектированы такие КППГ как карбоксиметиллизин, гидроимидазолон (образованный метилглиоксалем) и аргпиримидин.

14. Разработана модель, позволяющая провести оценку провоспалительного эффекта гидролизатов белков, выделенных из желтых и зеленых семян гороха, на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Протестированы гидролизаты белков, выделенные как из семян гороха, подвергнутых процедуре ускоренного старения *in vitro*, так и из соответствующих контрольных вариантов. Показано, что только в клетках, обработанных гидролизатом белка желтых семян гороха контрольной группы, есть статистически достоверная разница при сравнении с отрицательным контролем в отношении FADD, IκB и IKKα/β. Провоспалительное действие гидролизата белка желтых семян гороха контрольной группы, наблюдаемое в культуре клеток нейробластомы, было сопоставимо с эффектом, индуцированным липополисахаридами.

15. В ходе выполнения настоящего проекта впервые были изучены механизмы, ответственные за формирование качественных семян гороха *Pisum sativum* L. и рапса *Brassica napus* в ходе эмбриогенеза, и выявлены основные механизмы устойчивости семян к гликоокислительному повреждению и окислительному стрессу при их длительном хранении. Реализация проекта позволила установить, что основой повреждений, приводящих к ухудшению качества семян при хранении, являются процессы гликирования белков, перекисное окисление липидов и генерация активных форм кислорода. Снижение устойчивости семян к неблагоприятным условиям хранения инициируют также «остаточные» хлорофиллы. Удалось идентифицировать пептиды-продукты гликирования белков, а также метаболиты, которые могут служить маркерами повреждения качества семян при хранении.

Основные результаты проекта достигнуты в полном объеме.

По итогам выполнения проекта опубликованы статьи в научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS/Scopus, таких как International Journal of Molecular Sciences (импакт-фактор 3.687), Functional Plant Biology (импакт-фактор 2.083), Russian Journal of Plant Physiology. Результаты, полученные в ходе выполнения проекта, обсуждались в форме устных и стендовых докладов на 8 международных научных конференциях, в том числе 12th Triennial Conference of the International Society for Seed Science 2017, Plant Biology Europe Conference 2018 и др.

#### **5.4. Описание выполненных работ и полученных научных результатов (в том числе степень выполнения проекта) для публикации на сайте РФФИ – АННОТАЦИЯ – на русском и английском (до 3 страниц)**

*на русском языке (до 3 страниц текста, также указываются ссылки на информационные ресурсы в сети Интернет (url-адреса), посвященные проекту)*

Разработка научно-обоснованных подходов, направленных на совершенствование технологии получения семян высокого качества, является приоритетной задачей современного сельскохозяйственного производства. Несмотря на то, что в сельскохозяйственном производстве условия хранения семян оптимизированы, в случае длительного хранения семена постепенно накапливают структурные и метаболические повреждения и, в конечном счете, теряют жизнеспособность. В основе повреждений, приводящих к ухудшению качества семян при хранении, лежат гликирование белков, перекисное окисление липидов, генерация активных форм кислорода и свободных радикалов. В ходе выполнения настоящего проекта были изучены механизмы, ответственные за формирование качественных семян гороха *Pisum sativum* L. и рапса *Brassica napus* L. в ходе эмбриогенеза, и выявлены основные механизмы устойчивости семян к гликоокислительному повреждению и окислительному стрессу при их длительном хранении. Впервые выявлены связи между такими

биохимическими параметрами, как присутствие хлорофиллов в зрелых семенах, с одной стороны, и степенью гликоокислительного повреждения белков, а также их влиянием на здоровье человека, с другой. Устойчивость семян к окислению при хранении была оценена с использованием метода «ускоренного старения», позволяющего в краткие сроки моделировать повреждения, возникающие в семенах при длительном хранении. Для изучения этих механизмов был использован комплексный подход, основанный на проведении транскриптомного, протеомного и метаболомного анализа. Полученные результаты позволили выявить пептиды – продукты гликирования белков и метаболиты, которые могут служить маркерами качества семян рапса и гороха.

Проведен сравнительный анализ эмбриогенеза растений гороха, формирующих семена с желтыми (сорт Frisson) и зелеными (сорт Rondo) зародышами, и растений рапса (сорт Оредеж-2). Показано, что на начальных этапах эмбриогенеза перикарп, семенная кожура и зародыш имели зеленую окраску, содержали хлорофиллы *a* и *b* и были фотохимически активны. Активность фотохимических процессов была изучена методом РАМ-флуориметрии. У растений гороха, формирующих семена как с желтой, так и зеленой окраской, фотохимические процессы регистрировались как в кожуре, так и в семядолях, на самых ранних стадиях эмбриогенеза и прекращались на средней стадии созревания семян. Прекращение фотосинтеза и у гороха, и у рапса было сопряжено с началом обезвоживания тканей. Вероятно, именно обезвоживание, а не разрушение хлорофиллов, является триггером прекращения фотосинтеза при созревании семян. На средней стадии созревания зародыши морфологически полностью сформировывались и начинался процесс обезвоживания. В семенной кожуре это было сопряжено с лизисом клеточного содержимого, изменением ее окраски и увеличением светопрозрачности. У семян гороха кожура становилась бесцветной. У семян рапса она приобретала коричневую окраску. Структурных различий в процессах эмбриогенеза, формирования семени и перикарпия у сортов гороха, формирующих желтые и зеленые семена, не выявлено. Различия проявились только в темпах формирования семян (желтые семена формировались быстрее, чем зеленые) и их размеров (зеленые семена были более крупными). На поздних этапах созревания семян рапса наблюдалась высокая вариабельность по содержанию хлорофиллов в семядолях. Семена рапса с красно-коричневой кожурой содержали больше неразрушенных хлорофиллов, чем семена с темно-коричневой кожурой. Принципиальных различий в строении зародышей и семенной кожуры в таких семенах не было выявлено, за исключением некоторой сглаженности поверхности тегмена и тесты семенной кожуры у семян с красновато-коричневой окраской.

Проведен ультраструктурный анализ пластид формирующихся семян гороха и рапса с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. У гороха на ранних стадиях эмбриогенеза пластиды имели развитую тилакоидную систему, состоящую из небольших гран, межгранных тилакоидов и единичных крахмальных зерен. На средней стадии отмечалось увеличение размеров пластид и крахмальных зерен. На поздней стадии у большинства пластид наблюдались крупные крахмальные зерна, вдоль которых сохранялась лишь оболочка пластины и тонкий слой остатков стромы. Отличительной характеристикой сорта, формирующего желтые семена, являлось накопление большого количества пластоглобул в клетках семядолей. У сорта, формирующего зеленые семена, наблюдались лишь мелкие единичные пластоглобулы. По сравнению с горохом, семена рапса отличались тем, что на средней стадии созревания, наряду с исчезновением гран с тилакоидами, наблюдалось постепенное исчезновение крахмальных зерен и накопление липидов в форме липидных капель. Структура пластид у зрелых семян с красно-коричневой и темно-коричневой кожурой существенно не различалась. Остатков тилакоидных мембран в зрелых семенах рапса с красно-коричневой (и остаточными хлорофиллами) не было обнаружено.

С помощью высокопроизводительного секвенирования на геномном секвенаторе Illumina HiSeq2500 был проведен транскриптомный анализ семян гороха и рапса. Сравнительный анализ транскриптомов семян рапса *V. napus* позволил выявить около 350 генов, экспрессия которых дифференциально менялась (в 2 и более раз) на разных этапах эмбриогенеза. Максимальная представленность транскриптов наблюдалась для генов, кодирующих напин-, круциферин- и олеозин-подобные белки. Их содержание снижалось по мере созревания семян. При этом значительно накапливались транскрипты генов, кодирующих белки позднего эмбриогенеза.

Сравнительный анализ транскриптомов зародышей гороха сортов Frisson (желтые семена) и Rondo (зеленые семена) позволил выявить ряд генов, экспрессия которых дифференциально меняется в процессе формирования желтых и зеленых семян: *SDR*, *ABAR*, *GAR*, *CBP*, *TXN*, *LEA*. При помощи метода ОТ-ПЦР была выявлена экспрессия генов, кодирующих ферменты, принимающих участие в катаболизме хлорофиллов: *NYC1*, *HCAR*, *MgD*, *PPH*, *PAO* и *RCCR*, а также *LHCII*, который ответственен за синтез хлорофилл *a-b* связывающих белков. Несмотря на то, что на ранней стадии созревания семена гороха обоих сортов имели интенсивно зеленую окраску, экспрессия этих генов была выше у семян сорта Frisson, формирующих семядоли с желтой окраской. Однако на более поздней стадии, когда начиналось снижение содержания хлорофиллов, экспрессия генов *HCAR*, *MgD*, *PAO* и *RCCR* у сорта Rondo (зеленые семядоли) увеличивалась и не отличалась от сорта Frisson. При этом экспрессия *NYC1* и *PPH* оставалась низкой. Наиболее высокая экспрессия генов *LHCII*, *NYC1*, *HCAR*, *PAO* и *RCCR* у семян рапса наблюдалась на стадии, когда семядоли рапса имели интенсивную зеленую окраску и были фотохимически активны. Однако на последующих стадиях созревания

их экспрессия резко снижалась. Экспрессия генов *MgD* и *PPH* на начальной стадии была в полтора-два раза ниже по сравнению с другими генами, но на последующих стадиях эмбриогенеза существенно не снижалась. Интересно, что экспрессия *MgD* и *PPH* была практически в два раза ниже в семенах, у которых при созревании хлорофиллы разрушались не полностью.

Оценка устойчивости зрелых семян гороха к неблагоприятным условиям хранения была проведена при помощи метода ускоренного старения (УС). Установлено, что зеленые семена гороха были менее устойчивы к УС: у них в более высокой степени снижалась всхожесть и скорость прорастания, а также целостность клеточных мембран. Показано, что в зеленых семенах гороха уровень малонового диальдегида и пероксида водорода был в 2-4 раза выше, чем в желтых семенах. При помощи газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), выполнен анализ экстрактов, выделенных из полярной водно-спиртовой фракции. Анализ идентифицированных метаболитов при помощи метода главных компонент (МГК) показал существенные биохимические различия между зародышами желтых и зеленых семян гороха, которые усиливались после УС. Наиболее высокую значимость в этих различиях имели раффиноза, сахароза, галактинол, лимонная кислота и фосфорная кислота, содержание которых было выше в желтых семенах. После УС содержание указанных веществ снижалось в обоих вариантах. Снижение содержания сахарозы и раффинозы можно предложить в качестве маркеров оценки качества семян гороха при хранении. Протеомный анализ показал, что у зародышей гороха с зелеными семядолями было идентифицировано 24 значимо количественно отличающихся белка, среди которых 22 белка удалось разделить на 6 кластеров и ещё 2 белка были отнесены к отдельной группе. Среди идентифицированных белков 17 дифференциально экспрессировались в желтых и зеленых семенах. Был также идентифицирован хлорофилл *a-b* связывающий белок (chlorophyll *a-b* binding protein), представленный исключительно в зеленых семенах.

Проведен сравнительный анализ биохимических изменений в зрелых семенах рапса после УС и длительного хранения. Контролем являлись семена со всхожестью 99%. Через 4 года хранения или 1 сутки УС всхожесть семян снижалась до 91%. Через 9 лет хранения или 7 суток УС всхожесть семян снижалась до 46%. Механизмы повреждения семян рапса также были связаны с повреждением целостности клеточных мембран: при этом УС приводило к большей степени повреждения мембран, чем длительное хранение. Интересно, что семена рапса с красно-коричневой кожурой, которые содержали больше остаточных (не полностью разрушенных) хлорофиллов, были более чувствительны к УС, чем семена с темно-коричневой кожурой. Анализ метаболитных профилей семян рапса показал, что между семенами, старение которых происходило в условиях УС и длительного хранения, существуют значительные биохимические различия, что, по-видимому, связано с различной влажностью и температурой инкубации семян. В качестве маркеров снижения качества семян рапса при длительном хранении можно выделить альфа- и гамма-токоферолы, кампестерол и бета-ситостерол. Также интересен эффект накопления ненасыщенных жирных кислот: эруковой, олеиновой и линоленовой в семенах после УС и длительного хранения. УС инициировало изменение (увеличение или уменьшение) содержания 63 белков по сравнению с контролем, а у семян после длительного хранения значимо различалось содержание 96 белков, которые были распределены по шести основным кластерам. Наиболее значительные изменения белковых спектров наблюдались после 7 суток УС и 9 лет хранения. Следует особо отметить, что старение снижает содержание белков, которые отвечают за адаптацию семян к стрессорам: белков теплового шока БТШ-70, LEA-белков, тиоредоксина, Cu/Zn-супероксиддисмутазы, белков ERD (early-responsive to dehydration stress), а также белков, участвующих в репарации поврежденных белков и ДНК: DNA mismatch repair proteins MSH3 и Rad23 UV excision repair proteins.

С целью выявления гликированных триптических пептидов, которые могут являться маркерами снижения качества семян при хранении, была оптимизирована методика, основанная на глубоком ферментативном анализе белков. Полученные гидролизаты анализировали с помощью ультра-высокоэффективной обратнофазной хромато-масс-спектрометрии. В семенах рапса после УС были детектированы такие КППГ как карбоксиметиллизин, гидроимидазолон (образованный метилглиоксалем) и аргпиримидин. Установлено, что содержание КППГ [(лактоил)лизина, (карбоксиметил)аргинина, карбоксиэтиллизина и (карбоксиэтил)аргинина] было выше в семенах зеленого гороха по сравнению с желтыми семенами. При этом содержание КППГ повышалось также в результате ускоренного старения и термической обработки семян гороха.

Важной задачей исследования являлась разработка модели, позволяющей провести оценку провоспалительного эффекта гидролизатов белков, выделенных из семян гороха с желтыми и зелеными семядолями, в культуре клеток человека. Оценка провоспалительных эффектов полученных гидролизатов, полученных из семян гороха зародышей гороха с желтой окраской (сорт Миллениум) и зеленой окраской (сорт Глориоза), проводили при помощи клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. В клетках, инкубированных с гидролизатами белков контрольных необработанных семян, по сравнению с УС, было повышено содержание FADD и с-Мус, а также ИКК $\alpha/\beta$  и TNFR1 (у желтых семян); и NF- $\kappa$ B, ИкВ (у зеленых семян). Провоспалительный ответ стимулировался семенами, подвергнутыми УС, после термической обработки при 98°C.

The development of scientifically based approaches to improvement of high-quality seed production is a priority task in modern agriculture. Despite the fact that seed storage conditions are generally optimized in agricultural industry, seeds gradually accumulate structural and metabolic damages during long-term storage, and, ultimately, lose viability. These damages which lead to loss in seed quality during storage, include protein glycation, lipid peroxidation, and generation of reactive oxygen species and free radicals. This project focused on studying the mechanisms underlying the formation of high-quality seeds of pea (*Pisum sativum* L.) and rape (*Brassica napus*) during their embryogenesis. Major mechanisms of seed resistance to damage by protein glycation and oxidation, and to oxidative stress under long-term storage, were identified in this study. For the first time, we revealed links between biochemical features such as presence of chlorophylls, on the one hand, and degree of protein glycoxidation damage, on the other hand, as well as the impact of the latter to human health. Seed resistance to oxidation during storage was assessed using the "accelerated aging" method allowing for fast modelling of damages which naturally occur during seed long-term storage. To study these mechanisms, we applied an integrated approach based on transcriptome, proteome and metabolome analyzes. The obtained results allowed us to identify peptides – products of protein glycation, and metabolites that can serve as markers for rapeseed and pea seed quality.

In this project, we have performed a comparative analysis of the embryogenesis of two pea varieties which form either yellow embryos (Fisson variety) or green embryos (Rondo variety), as well as rapeseed plants (Oredez-2 variety). Pericarp, seed cover and embryo were green, contained chlorophylls *a* and *b*, and were photochemically active. The activity of photochemical processes was studied by PAM fluorimetry. Photochemical processes were detected in both seed cover and cotyledons since the very early stages of embryogenesis and then stopped at the middle stage of seed maturation both in green and yellow seed forming plants. The termination of photosynthesis in both pea and rapeseed was linked to the onset of tissue dehydration. Presumably, seed dehydration rather than chlorophyll degradation, trigger the stoppage of photosynthesis during seed maturation. At the middle stage of maturation, the embryos exhibited completely formed morphology and started the process of dehydration. In the seed cover, this was associated with lysis of the cell contents, a change in its color and an increase in its transparency. Seed peel became colorless in pea, and was colored brown in rape, respectively. No differences were found in yellow and green pea seeds for the processes of embryogenesis and seed and pericarp formation. The only differences found were in seed maturation pace (yellow seeds matured faster than green ones) and in seed size (green seeds were larger). Increased variation in chlorophyll content in cotyledons was observed in rape seeds at the later stages of maturation. Rape seed with brown-red seed cover contained higher level of intact chlorophylls than seeds with dark brown cover. Among these seeds, no significant differences were found in structure of embryos and the seed cover, except for some smoothness of tegmen and testa surfaces in reddish-brown colored seeds.

Ultrastructure of plastids was analyzed in rape and pea seeds using transmission electron microscopy. In pea seeds at early stages of embryogenesis, plastids exhibited a developed thylakoid system consisting of small granes, intergranal thylakoids, and single starch grains. Then plastids and starch grains increased in size at the middle stage of seed maturation. At the later stages of maturation, the majority of plastids contained large starch granules wrapped with chloroplast envelope and a thin layer of stroma remains. A remarkable feature of pea variety that forms yellow seeds was the deposition of numerous plastoglobules in the cells of cotyledons. In contrast, pea variety forming green seeds showed only small single plastoglobules. Compared to pea, rape seeds maturation was different at the middle stage: starch granules gradually disappeared along with grana and thylakoid deconstruction and lipid accumulation in form of lipid droplets. The structure of plastids had no significant differences between brown-red and dark brown rape seeds. No residues of thylakoid membrane was found in brown-red rape mature seeds (still containing residual chlorophylls).

We have completed the transcriptome analysis of pea and rape seeds using high-throughput sequencing on Illumina HiSeq2500 genomic sequencer. *Brassica napus* transcriptome comparative analysis revealed about 350 genes, the expression of which was progressively changing (2-fold or more) at different stages of the embryogenesis. The maximum representation of transcripts was observed for napin-, cruciferin-, and oleosin-like protein-encoding genes. Their content decreased as the seeds matured. Herewith, transcripts of genes encoding proteins of late embryogenesis accumulated significantly.

Comparative analysis of pea seed transcriptomes in Frisson cultivar (yellow seeds) and Rondo cultivar (green seeds) revealed a number of genes, expression of which differentially changed in course of yellow and green seed maturation: *SDR*, *ABAR*, *GAR*, *CBP*, *TXN*, *LEA*. Using RT-PCR, the following chlorophyll catabolism-related gene expression was studied: *NYCI*, *HCAR*, *MgD*, *PPH*, *PAO* and *RCCR*, as well as *LHCII*, that is responsible for the synthesis of chlorophyll *a-b* binding proteins. Despite the fact that at the early stage of seed maturation, seeds of both pea cultivars were colored intensively green, expression of the aforementioned genes was higher in seeds of Frisson cultivar which form yellow cotyledons. However, at a later stage at which the chlorophyll content begins to cease, expression of *HCAR*, *MgD*, *PAO* and *RCCR* in Rondo cultivar (green cotyledons) increased and showed no differences from the Frisson cultivar. At the same time, expression of *NYCI* and *PPH* remained low. The highest level of the *LHCII*, *NYCI*, *HCAR*, *PAO* and *RCCR* gene expression in rape seeds was observed at the stage when the rapeseed cotyledons were colored intensively green and were photochemically active. However, at subsequent stages of maturation, their

expression sharply decreased. The initial expression of the *MgD* and *PPH* genes was one and a half to two times lower compared to other genes but did not significantly decrease at the subsequent stages of embryogenesis. Interestingly, the expression of *MgD* and *PPH* was almost two times lower in seeds that did not completely lose chlorophylls during the maturation.

We have completed the assessment of pea seed resistance to unfavorable storage conditions using accelerated aging method (AA). We have found that green pea seeds were less resistant to AA: their germination rate and germination development speed decreased, as well as cell membranes suffered from damages. It was shown that in green pea seeds, levels of malondialdehyde and hydrogen peroxide were 2-4 times higher than in yellow seeds. Using gas chromatography–mass-spectrometry (GC-MS), we analyzed extracts from water-alcohol fraction. Principal component analysis (PCA) demonstrated substantial differences between the embryos of yellow and green pea seeds, and these differences were more pronounced after AA. The most significant differences were found for the content of raffinose, sucrose, galactinol, citrate and phosphate which were higher in yellow seeds. These metabolite levels decreased in both cultivars after AA. We suggest sucrose and raffinose levels as markers for pea seed quality assessment during storage. Proteome analysis discovered 24 significantly different protein levels which were divided into 6 clusters, and two additional proteins belonged to a separate group. Within identified proteins, 17 were expressed differentially in yellow and green seeds. Chlorophyll a-b binding protein was also identified, but in green seeds only.

We have completed the comparative analysis of biochemical changes in mature rape seeds during the long-term storage and accelerated aging (AA). The control seeds had a germination of 99%. After 4 years of storage or 1 day of AA, seed germination fell to 91%. After 9 years of storage or 7 days of AA, seed germination fell to 46%. Rape seed damage mechanisms were associated with damage to the cell membrane integrity: in this case, AA led to a higher degree of membrane damage than long-term storage. Interestingly, rape seeds with brown-red cover contained higher level of residual (incompletely degraded) chlorophylls and were more susceptible to AA than seeds with dark-brown cover. Rape seed metabolite profiling demonstrated remarkable differences in biochemistry of seeds after long-term storage and after AA, that is presumably due to the different temperature and humidity during seed incubation. Alpha- and gamma-tocopherols, campesterol and beta-sitosterol were suggested as a loss-of-quality markers for rape seeds. The effect of unsaturated fatty acid accumulation (erucic, oleic and linolenic fatty acids) under AA and long-term storage is also remarkable. AA triggered changes in level (increase or decrease) of 63 proteins when compared to control, whereas long-term storage led to a significant differences in content of 96 proteins which belonged to six major clusters. The most different protein spectra was observed in pea seeds after 7 days of AA and after 9 years of storage. We especially highlight that aging decrease the content of proteins that are responsible to seed adaptation to stressors: heat-shock proteins HSP-70, LEA proteins, thioredoxin, Cu/Zn-superoxidedismutase, ERD proteins (early-responsive to dehydration stress), as well as proteins involved into reparation of damaged DNA and proteins: DNA mismatch repair proteins MSH3 and Rad23 UV excision repair proteins.

To identify glycated tryptic peptides, which can serve as markers of decrease in seed quality during their storage, we optimized the technique based on a deep enzymatic analysis of proteins. Protein hydrolysates were analyzed using ultra-high-performance reverse phase liquid chromatography-mass spectrometry. In rape seeds after AA, were detected the following advanced glycation end products (AGEs): such as carboxymethyl lysine, hydroimidazolone (formed by methylglyoxal), and argpyrimidine. It was found that AGEs content [(lactoyl)lysine, (carboxymethyl)arginine, carboxyethyllysine and (carboxyethyl)arginine] was higher in green pea seeds when compared to yellow seeds. At the same time, the content of AGEs increased also in result of AA and pea seed temperature treatment.

This project also included the development of a model that allows to test the pro-inflammatory effect of protein hydrolysates from yellow and green pea seeds in human cell culture. Pro-inflammatory effect of protein hydrolysates from yellow pea seeds (Millennium cultivar) and green pea seeds (Gloriosa cultivar) was tested in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. Cells incubated with protein hydrolysates from control untreated seeds, when compared to AA, showed increased levels of FADD and c-Myc, as well as IKK $\alpha/\beta$  и TNFR1 (extracts from yellow seeds); and NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B (extracts from green seeds). Pro-inflammatory effect was also stimulated by extracts from seeds under AA, after temperature treatment at 98°C.

**5.9. Возможность практического использования результатов проекта в экономике и социальной сфере**  
*(при наличии, в том числе формирование научных и технологических заделов, обеспечивающих экономический рост и социальное развитие Российской Федерации, создание новой или усовершенствование производимой продукции (товаров, работ, услуг), создание новых или усовершенствование применяемых технологий)*

Результаты могут быть использованы в селекции при создании новых сортов высокоурожайных сельскохозяйственных культур и в сельском хозяйстве при оценке качества посевного материала.

**5.10. Оценка вклада результатов проекта в решение конкретных задач и ключевых проблем научного приоритета**

Концепция долгосрочного социально-экономического развития РФ на период до 2020 предусматривает развитие наукоемких сельскохозяйственных технологий и производства экологически чистых продуктов. В

этой связи разработка научно-обоснованных подходов, направленных на совершенствование технологии получения семян высокого качества, является приоритетной задачей современного сельскохозяйственного производства. Полученные в ходе выполнения проекта результаты позволили установить связь между содержанием в семенах хлорофиллов, уровнем окислительных процессов и гликоокислительным повреждением белков. Эти результаты могут быть использованы для совершенствования технологий получения семян, устойчивых к окислительному стрессу при хранении. Выявлены биохимические маркеры – метаболиты, которые могут быть использованы при оценке качества семян с использованием метаболомных подходов.