

Молекулярные механизмы ответа клеточной стенки ячменя на различные типы ионизирующего излучения

Празян А.^{1*}, Подлущий М.¹, Бондаренко Е.¹, Волкова П.², Казакова Е.¹,
Битаришвили С.¹, Шестерикова Е.¹, Макаренко Е.¹, Лыченкова М.¹,
Гераськин С.¹, Король М.¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Обнинск, Россия*

² *Независимый исследователь, Гел, Бельгия*

* *prazyana@yahoo.com*

Ключевые слова: ячмень; радиация; DEG; электрон; протон; гамма

Мотивация и цель: Повышение урожайности сельскохозяйственных культур имеет решающее значение для современного мира, где обеспечение продовольственной безопасности является первостепенной задачей. Увеличение частоты экстремальных климатических условий создает дополнительную нагрузку на сельскохозяйственные растения, что требует разработки стратегий адаптации [1]. Ионизирующее излучение (ИИ) дает представление о механизмах адаптации растений к абиотическим стрессорам, активируя антиоксидантную защиту и механизмы репарации ДНК [2, 3]. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – важный сельскохозяйственный вид, является потенциальным объектом для повышения урожайности и улучшения устойчивости. Радиобиологические исследования реакций ячменя выявляют молекулярные пути, участвующие в адаптации к абиотическим стрессам [4–6]. Было проведено расширенное мультиомиксное исследование с использованием ионизирующего излучения с низким и высоким ЛПЭ для обработки семян озимого ячменя [7]. Полный сравнительный анализ общего эффекта трех типов ИИ на транскриптомный профиль ячменя, а также дополнительные материалы представлены в [8].

В нашем исследовании мы использовали гамма-, электронное и протонное излучение в сочетании с секвенированием всего транскриптома, чтобы идентифицировать общие ответные транскрипты и оценить их роль в реакциях на стресс.

Методы и алгоритмы: Семена озимого ячменя сорта Фокс 1 были посажены в горшки с почвой и пророщены в контролируемых условиях. Сеянцы были облучены на 7-й день после посева, а листья были собраны через 24 часа после облучения. Растения из одного горшка были объединены в одну пробу.

Проростки подвергались воздействию γ -излучения, электронов и протонов в дозе 15 Гр с использованием источника γ -излучения «Агат» (изотоп ^{60}Co), линейного ускорителя электронов NOVAC11 и комплекса протонной терапии «Прометей». Дозиметрия проводилась в соответствии с установленными протоколами для обеспечения точного облучения.

Подготовка библиотек и секвенирование были проведены компанией «Евроген» (Москва, Россия) на Illumina NovaSeq 6000 (2×150 пар оснований). Обработка данных включала контроль качества, фильтрацию низкокачественных прочтений и выравнивание прочтений с использованием эталонного транскриптома ячменя (BaRTv2.18). Дифференциальная экспрессия генов анализировалась с

использованием DESeq2 для выявления генов, экспрессия которых значимо различалась между контрольными и облученными образцами. Полученные данные аннотировались и анализировались с использованием баз данных UniProt и NCBI для получения дополнительной информации о белках и их функциях. Для лучшего понимания биологических процессов, затронутых ионизирующим излучением, был проведен функциональный анализ обогащения с использованием базы данных Gene Ontology. Этот анализ позволил выявить группы генов, ассоциированные с определенными биологическими процессами, молекулярными функциями и клеточными компонентами, которые значительно изменились после облучения.

Результаты: Дифференциальный анализ экспрессии генов в растениях после воздействия гамма-, протонного и электронного излучения выявил 553 уникальных гена с повышенной экспрессией и 124 гена с пониженной экспрессией. При сравнении общих транскрипционных ответов на три типа облучения было выявлено 47 общих ДЭГ. Ионизирующее излучение воздействует на клетки растений, превращая нейтральные атомы или молекулы в активное состояние. Этот процесс вызывает различные биологические эффекты, включая модуляцию систем сигнальной передачи растений и индукцию окислительного стресса за счет увеличения продукции активных форм кислорода (АФК). Наше исследование подчеркивает значительное влияние трех типов ИИ на ячмень на молекулярном уровне, особенно выражающееся в повышении экспрессии генов, связанных с биосинтезом и модификацией клеточной стенки, таких как синтазы целлюлозы (*D9IXC7* и *F2DMG1*) и бета-галактозидазы (*A0A8I6X4I5*). Синтазы целлюлозы критически важны для производства целлюлозы, основного компонента клеточной стенки, в то время как бета-галактозидазы участвуют в модификации и ремоделировании полисахаридов клеточной стенки. Эти изменения предполагают адаптивный ответ для укрепления целостности и функции клеточной стенки под воздействием стресса. Два гена лакказы (*F2DXF2* и *F2D9J2*) имели повышенную экспрессию при всех типах ИИ. Лакказы являются оксидоредуктазными ферментами, которые катализируют окислительные реакции с участием ароматических и неароматических соединений, играя важную роль в функционировании клеточной стенки и биodeградации лигнина. Ранее лакказы ассоциировались с улучшением устойчивости к засухе за счет повышения водотранспортной способности и усиления антиоксидантных ответов у других видов растений. Ген *MOXEM7* также имел повышенную экспрессию. Этот ген важен для прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок, что включает биосинтез и модификацию клеточной стенки, указывая на его роль в поддержании целостности клеточной стенки при стрессе, вызванном ИИ. Кроме того, имел повышенную экспрессию ген, кодирующий белок, похожий на гермин 5-1 (GLP, кодируемый *A0A287KQB5*), известный своей ролью в накоплении лигнина и уменьшении содержания H_2O_2 через активность ферментов, связанных с АФК, что указывает на двойную роль в укреплении клеточных стенок и управлении окислительным стрессом. Мы также отметили повышение экспрессии генов, связанных с метаболизмом фитогормонов, особенно тех, которые связаны с биосинтезом и сигнальной передачей ауксинов (*A0A8I6YN81* и *A0A8I6XJC3*). Ауксины важны для регуляции ответов растений на стресс, включая модификацию клеточной стенки. Известно, что экспрессия синтаз целлюлозы и бета-галактозидаз регулируется фитогормонами, что позволяет предположить, что изменения

в балансе фитогормонов, вызванные ИИ, могут модулировать биосинтез и ремоделирование клеточной стенки в рамках адаптивного ответа растений.

Выводы: Клеточная стенка, вероятно, является одной из основных целей облучения γ -, электронами и протонами, что характеризуется значительным увеличением экспрессии генов, участвующих в ее биосинтезе, модификации и укреплении. Этот защитный ответ на уровне клеточной стенки, скорее всего, служит для поддержания структурной целостности и управления окислительным стрессом, вызванным ИИ. Понимание молекулярных механизмов может способствовать разработке стратегий увеличения устойчивости растений к абиотическим стрессам, что потенциально может улучшить урожайность и качество урожая в неблагоприятных климатических условиях, так как обнаруженные общие реагирующие молекулы также участвуют в ответах на другие абиотические стрессовые факторы (засуха, соленость, воздействие тяжелых металлов).

Благодарности: Ячменные зерна были любезно предоставлены Российским научным учреждением «Научно-исследовательский центр сельского хозяйства «Донской». Мы также выражаем нашу благодарность Медицинскому радиологическому исследовательскому центру им. А.Т. Цыба за облучение наших растений различными типами ионизирующего излучения.

Финансирование: Эта работа была финансово поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Договор № 075-15-2021-1068 от 28 сентября 2021 г.).

Molecular mechanisms of barley cell wall response to different types of ionising radiation

Prazyan A.^{1*}, Podlutskiy M.¹, Bondarenko E.¹, Volkova P.², Kazakova E.¹, Bitarishvili S.¹, Shesterikova E.¹, Makarenko E.¹, Lychenkova M.¹, Geras'kin S.¹, Korol M.¹

¹ Russian Institute of Radiology and Agroecology of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Obninsk, Russia

² Independent Researcher, Geel, Belgium

*prazyana@yahoo.com

Key words: barley; radiation; DEG; electron; proton; gamma

Motivation and Aim: Enhancing crop yield is crucial for the modern world, where ensuring food security is paramount. The increasing frequency of extreme climatic conditions poses additional stress on agricultural plants, necessitating the development of adaptation strategies [1]. Ionizing radiation (IR) offers insights into plant adaptation mechanisms to abiotic stressors, activating antioxidant defense and DNA repair mechanisms [2, 3]. Barley (*Hordeum vulgare* L.), a significant agricultural species, shows potential for yield enhancement and resilience improvement. Radiobiological studies of barley responses reveal molecular pathways involved in abiotic stress adaptation [4–6]. An extended multiomics experiment involving ionising radiation with low- and high-LET exposure of winter barley seedlings was performed [7]. The full comparative analysis of the common effect of the three types of IR on transcriptomic profile of barley, along with additional materials, are presented in [8].

In our study we employed gamma, electron, and proton radiation, coupled with whole-transcriptome sequencing, to identify commonly responsive transcripts and assess their role in stress responses.

Methods and Algorithms: Winter barley cultivar Fox 1 seeds were planted in soil-filled pots and germinated under controlled conditions. Seedlings were irradiated on the 7th day after sowing, and leaves were harvested 24 hours post-irradiation. Plants from the same pot were pooled into one sample.

Seedlings were exposed to γ -radiation, electrons, and protons at a dose of 15 Gy using γ -radiation source “Agat” (^{60}Co isotope), NOVAC11 linear electron accelerator, and Prometheus Proton Therapy Complex. Dosimetry was performed according to established protocols to ensure accurate exposure.

Library preparation, and sequencing were provided by the “Evrogen” (Moscow, Russia) at Illumina NovaSeq 6000 (2×150 bp). Data processing involved quality control, filtering of low-quality reads, and alignment of sequenced reads using the barley reference transcriptome (BaRTv2.18). Differential gene expression was analyzed using DESeq2 to identify genes, the expression of which significantly differed between control and irradiated samples. The obtained data was annotated and analyzed using UniProt and NCBI databases to obtain additional information about the proteins and their functions. For a better understanding of the biological processes affected by ionizing radiation, functional enrichment analysis was performed using the Gene Ontology database. This analysis allowed the identification of gene groups associated with specific biological processes, molecular functions, and cellular components that were significantly altered after irradiation.

Results: The differential gene expression analysis in plants following exposure to gamma, proton, and electron radiation, revealed 553 unique genes with increased expression and 124 genes with decreased expression. When comparing transcriptional responses to the three types of irradiations, 47 common DEGs were identified. Ionising radiation affects the plant cells, converting neutral atoms or molecules into reactive ions. This process triggers various biological effects, including the modulation of plant signalling systems and induction of oxidative stress via increased production of reactive oxygen species (ROS). Our study highlights the significant impact of the three types of IR on barley at the molecular level, particularly upregulating genes associated with the cell wall biosynthesis and modification, such as cellulose synthases (*D9IXC7* and *F2DMG1*) and beta-galactosidase (*A0A8I6X4I5*). Cellulose synthases are critical for the production of cellulose, a major component of the cell wall, while beta-galactosidases are involved in the modification and remodeling of cell wall polysaccharides. These changes suggest an adaptive response to reinforce cell wall integrity and function under stress. Two laccase genes (*F2DXF2* and *F2D9J2*) were upregulated across all types of IR exposure. Laccases are multicopper oxidase enzymes that catalyse oxidative reactions involving aromatic and non-aromatic compounds, playing a vital role in cell wall functioning and lignin biodegradation. Laccases have been previously associated with improving drought tolerance by enhancing water transport capacity and strengthening antioxidant responses in other plant species. The gene *MOXEM7*, encoding a Cd^{2+} -induced protein (nucleotide-diphospho-sugar transferase), was also upregulated. This gene is essential for pollen germination and tube growth, which involves cell wall biosynthesis and modification, indicating its role in maintaining cell wall integrity under IR-induced stress. Additionally, germin-like protein 5-1 (GLP, encoded by *A0A287KQB5*), known for its involvement in lignin accumulation and reduction of H_2O_2

content through ROS-related enzyme activity, was upregulated. This suggests a dual role in reinforcing cell walls and managing oxidative stress. We have also noted the upregulation of genes involved in phytohormone metabolism, particularly those related to auxin biosynthesis and signalling (*A0A8I6YN81* and *A0A8I6XJC3*). Auxins are crucial for regulating plant stress responses, including cell wall modifications. The expression of cellulose synthases and beta-galactosidases is known to be influenced by phytohormones, suggesting that IR-induced changes in phytohormone balance may modulate cell wall biosynthesis and remodeling as part of the plant's adaptive response.

Conclusion: The cell wall appears to be one of the main targets of γ -, electrons, and protons irradiation, characterized by significant upregulation of genes involved in its biosynthesis, modification, and reinforcement. This protective response at the cell wall level most probably serves to maintain structural integrity and manage the oxidative stress induced by IR. Understanding the molecular mechanisms can contribute to developing strategies to enhance plant resilience to abiotic stresses, potentially improving crop yield and quality in adverse environmental conditions, as the revealed commonly responsive molecules are also involved in responses to other abiotic stress factors (drought, salinity, exposure to heavy metals).

Acknowledgements: The barley grains were kindly provided by the Russian State Scientific Establishment “Agricultural Research Center “Donskoy””. And we would like to express our gratitude to the A. Tsyb Medical Radiological Research Centre in Obninsk, Russia, for irradiating our plants with various types of ionizing radiation.

Funding: This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1068 of September 28, 2021).

Список литературы/References

1. Cordell D., Drangert J.O., White S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environ Change*. 2009;19(2):292-305
2. Duarte G.T., Volkova P.Y., Fiengo Perez F., Horemans N. Chronic ionizing radiation of plants: an evolutionary factor from direct damage to non-target effects. *Plants*. 2023;12(5):1178. doi 10.3390/plants12051178
3. Podlutskii M., Babina D., Podobed M., Bondarenko E., Bitarishvili S., Blinova Y., Shesterikova E., Prazyan A. et al. *Arabidopsis thaliana* accessions from the Chernobyl exclusion zone show decreased sensitivity to additional acute irradiation. *Plants*. 2022;11(22):3142. doi 10.3390/plants11223142
4. Geras'kin S., Churyukin R., Volkova P. Radiation exposure of barley seeds can modify the early stages of plants' development. *J Environ Radioact*. 2017;177:71-83. doi 10.1016/j.jenvrad.2017.06.008
5. Kim J.H., Ryu T.H., Lee S.S., Lee S., Chung B.Y. Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. *Plant Sci*. 2019;278:44-53. doi 10.1016/j.plantsci.2018.10.013
6. Ali H., Ghorri Z., Sheikh S., Gul A. Effects of Gamma Radiation on Crop Production. In: Hakeem K. (Ed.). *Crop Production and Global Environmental Issues*. Springer, 2015:27-78. doi 10.1007/978-3-319-23162-4_2
7. Volkova P., Prazyan A., Podlutskii M. et al. Multi-omics responses of barley seedlings to low and high linear energy transfer irradiation. *Environ Exp Bot*. 2024;218:105600. doi 10.1016/j.envexpbot.2023.105600
8. Prazyan A., Podlutskii M., Volkova P. et al. Comparative analysis of the effect of gamma-, electron, and proton irradiation on transcriptomic profile of *hordeum vulgare* L. seedlings: in search for molecular contributors to abiotic stress resilience. *Plants*. 2024;13(3):342. doi 10.3390/plants13030342