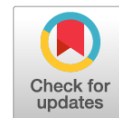


DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen623592>

Научная статья



Метаболическое профилирование листьев четырех видов лютика

П.Д. Смирнов¹, Р.К. Пузанский^{1, 2}, С.А. Ванисов¹, М.Д. Дубровский¹, А.Л. Шаварда^{1, 2},
М.Ф. Шишова¹, В.В. Емельянов¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Способность устойчивых растений-гидрофитов произрастать в обедненной кислородом среде обеспечивается наличием у них различных приспособлений, многие из которых опосредованы существенными изменениями метаболизма. Цель настоящей работы состояла в метаболическом профилировании листьев гидрофитных *Ranunculus lingua*, *R. repens*, *R. sceleratus* и мезофитного *R. acris*, собранных в естественных местах обитания, с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии для выявления характерных изменений метаболома, свойственных устойчивым к затоплению растениям. Полученные профили включали 360 соединений. Из них идентифицировано 74 соединения, 109 были определены до класса. Наиболее широко представлены сахара — 114 соединений. Кроме того, идентифицировано 10 аминокислот, 23 органические кислоты, а также липофильные и фенольные соединения. Профили метаболитов группировались согласно видовой принадлежности. Гидрофитный *R. sceleratus*, произраставший в условиях затопления, показал наибольшее своеобразие метаболома, характеризующегося пониженным уровнем сахаров и накоплением интермедиатов анаэробного метаболизма, азотного обмена и альтернативных путей реокисления НАД(Ф)Н. Профиль мезофитного *R. acris* сильно отличался пониженным содержанием аминокислот, жирных кислот и стероидов. Метаболитные профили *R. lingua* и *R. repens* занимали промежуточное положение. Очевидно, выявленные различия метаболомов видов лютика обусловлены генетическими детерминантами, экологической нишей и непосредственным воздействием стрессора (затопление).

Ключевые слова: гипоксия; мезофит; гидрофиты; метаболомика; газовая хроматография-масс-спектрометрия; ГХ-МС; *Ranunculus acris*; *R. lingua*; *R. repens*; *R. sceleratus*.

Как цитировать

Смирнов П.Д., Пузанский Р.К., Ванисов С.А., Дубровский М.Д., Шаварда А.Л., Шишова М.Ф., Емельянов В.В. Метаболическое профилирование листьев четырех видов лютика // Экологическая генетика. 2023. Т. 21. № 4. С. 369–382. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen623592>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen623592>

Research Article

Metabolic profiling of leaves of four *Ranunculus* species

Pavel D. Smirnov¹, Roman K. Puzanskiy^{1,2}, Sergey A. Vanisov¹, Maksim D. Dubrovskiy¹, Alexey L. Shavarda^{1,2}, Maria F. Shishova¹, Vladislav V. Yemelyanov¹¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;² Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Plant ability to survive oxygen deficiency is associated with the presence of various adaptations, majority of which are mediated by significant changes of metabolism. These alterations allow resistant wetland plants to grow even in an oxygen-depleted environment.

AIM: To compare metabolic profiles of the leaves of the wetland species *Ranunculus lingua*, *R. repens* and *R. sceleratus*, and the mesophyte species *R. acris* growing in their natural habitat in order to identify the most characteristic metabolic traits of hypoxia-resistant plants.

MATERIALS AND METHODS: Metabolite profiling was performed by GC-MS. Statistical analysis of metabolomics data was processed using R 4.3.1 Beagle Scouts.

RESULTS: The resulting profile included 360 compounds. 74 of these were identified and 114 compounds were determined to a class. Sugars (114) were the most widely represented in the obtained profiles. 10 amino and 23 carboxylic acids, lipids and phenolic compounds have been identified. Significant differences were revealed between the profiles of leaf metabolomes of all tested species, which were clustered according to phylogenetic relation. The hydrophytic *R. sceleratus*, growing under submergence, showed the most unique metabolome, in which the level of sugars was reduced and intermediates of anaerobic metabolism, nitrogen metabolism, and alternative pathways of NAD(P)H reoxidation were accumulated. The profile of mesophytic *R. acris* was markedly different by decreased levels of amino acids, fatty acids and sterols. The metabolite profiles of waterlogged hydrophytes *R. lingua* and *R. repens* occupied an intermediate position.

CONCLUSIONS: The identified differences of metabolomes of *Ranunculus* species are due to genetic determinants, ecological niche and direct impact of a stressor.

Keywords: hypoxia; mesophyte; hydrophytes; metabolomics; GC-MS; *Ranunculus acris*; *R. lingua*; *R. repens*; *R. sceleratus*.

To cite this article

Smirnov PD, Puzanskiy RK, Vanisov SA, Dubrovskiy MD, Shavarda AL, Shishova MF, Yemelyanov VV. Metabolic profiling of leaves of four *Ranunculus* species. *Ecological genetics*. 2023;21(4):369–382. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen623592>

Received: 19.10.2023

Accepted: 29.11.2023

Published: 24.01.2024

АКТУАЛЬНОСТЬ

Понятие индивидуального «метаболического профиля» внутренней среды организма, отражающего состояние пациента, сформировалось в медицине к середине XX в. Методы хроматографического анализа состава метаболитов стали активно применяться в клинических исследованиях с конца 1960-х годов [1]. С развитием системно-биологических дисциплин по аналогии с терминами «геном» и «протеом» в 1998 г. для обозначения совокупности всех метаболитов биологической системы был предложен термин «метаболом» [2]. В настоящее время метаболомный подход широко применяется в медицине, спортивной биологии и ветеринарии [3]. Только к концу XX в. были разработаны методы экстракции, дериватизации и хроматографии, применимые для изучения растений [4]. С 2000 г. начался экспоненциальный рост исследований, посвященных изучению метаболома растений. Метаболическое профилирование является относительно дешевым и быстрым способом фенотипирования биохимического состояния (хемотипирования) растений. Этот подход применяется для изучения процессов как у модельных объектов, так и у сельскохозяйственных и дикорастущих растений. Метаболомный анализ используется для фенотипирования сортов, популяций и видов растений. Преимущества метаболомных исследований заключаются в том, что они позволяют оценить сложные изменения обмена веществ растений в процессе развития и выявлять биохимические особенности различных тканей и органов в нормальных и стрессовых условиях. Исследования последних лет направлены на выяснение метаболической изменчивости под действием как абиотических, так и биотических стрессовых факторов (засухи, засоления, низких и высоких температур, тяжелых металлов, атаки патогенов и др.) [5]. К сожалению, количество работ, посвященных метаболическому профилированию растений в условиях такого воздействия, как дефицит кислорода, весьма ограничено по сравнению с исследованиями, анализирующими другие типы стрессовых воздействий [6].

Дефицит (гипоксия) или полное отсутствие (аноксия) кислорода — достаточно распространенный неблагоприятный фактор среды, который возникает в агроценозах и природных растительных сообществах в связи с временным или постоянным переувлажнением, с избытком воды при наводнениях, весенних паводках и во время выпадения обильных осадков, формированием асфальтового покрытия, уплотнения почв и т. п. [7, 8]. Ежегодные потери урожая от кислородной недостаточности составляют до 50 % в год [8, 9]. Дефицит кислорода в этих условиях приводит к значительным изменениям обмена веществ растений, в частности подавлению аэробного дыхания и оксигенного фотосинтеза и, как следствие, сильнейшему кризису энергетического метаболизма [7, 8, 10]. Единственным процессом, способным поставлять

молекулы АТФ при гипо-/аноксии, становится гликолиз с последующим молочнокислым и спиртовым брожением, что провоцирует накопление токсичных продуктов анаэробного обмена, таких как ацетальдегид и этанол, а также закисление цитоплазмы [7, 10]. Тем не менее именно в ходе брожений происходит окисление НАДН, необходимое для эффективного функционирования гликолиза. У ряда устойчивых к гипоксии растений показана способность перенаправлять промежуточные метаболиты гликолиза в альтернативные аноплетротические пути, которые приводят к накоплению малата, сукцината, глицерина, аланина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [7, 10]. Синтез этих альтернативных гипоксических метаболитов позволяет растению реокислять НАД(Ф)Н в НАД(Ф)⁺, необходимый для гликолиза, и предотвращает аккумуляцию токсичных метаболитов во время кислородной недостаточности. Важно отметить, что накопление аланина и ГАМК также предотвращает закисление цитоплазмы при гипо-/аноксии [10]. Эти результаты получены методами конвенциональной классической биохимии.

В последние годы появились данные о проведении метаболомных исследований резуховидки [11], лядвенца [12], риса [13, 14], пшеницы [13, 15], ячменя [16], сои [17] и других культурных растений. Известны также единичные сообщения о воздействии недостатка кислорода на метаболом водных растений — гидрофитов: взморника (*Zostera marina*) [18] и рдеста (*Potamogeton anguillanus*) [19]. Сопоставление данных метаболомного профилирования различных растений при действии гипо-/аноксии, недавно проведенное в обзоре [20], позволило выявить «отпечатки метаболических пальцев», специфичные для растений в условиях дефицита кислорода. В большинстве случаев были показаны существенные изменения уровня содержания растворимых сахаров, аккумуляция пирувата, сукцината и лактата в тканях растений. Кроме того, у них преимущественно возрастало содержание аминокислот, связанных с такими метаболитами гликолиза, как фосфоглицерат (серин и глицин), фосфоенолпируват (фенилаланин, тирозин и триптофан) и пируват (аланин, лейцин и валин). Накапливались также аминокислоты — производные аспартата (аспарагин, лизин, метионин, треонин и изолейцин), глутамат и его производные (пролин, аргинин и ГАМК), которые, как известно, связывают гликолиз с измененным в бескислородной среде циклом Кребса и обеспечивают альтернативные пути окисления НАД(Ф)Н, что позволяет избежать чрезмерного накопления токсичных метаболитов брожения [7, 10, 12, 20, 21]. Весьма любопытно, что среди 63 проанализированных сортов, линий и видов растений 40 были от средне- до сильноустойчивых к дефициту кислорода [20], то есть вышеизложенные «отпечатки метаболических пальцев» характерны в основном для видов, адаптированных к гипоксии. Уровень сахаров также сильно варьировал в метаболических профилях разных растений. Выявленные изменения метаболомов касаются

кислородной недостаточности в широком смысле, от гипоксии до аноксии, поскольку в разных экспериментах авторы использовали различные способы создания и сроки действия данного стрессора. Отсутствие стандартизации аналитических методов метаболического профилирования [газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез-масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс] также приводило к нескольким разным результатам профилирования даже у одних и тех же растений. Имеющиеся в настоящее время данные, к сожалению, не позволяют сделать окончательный вывод, какой из метаболитов и/или метаболических путей можно признать специфичным для гипоксии и/или аноксии. Нельзя также однозначно различить метаболические профили устойчивых и неустойчивых к дефициту кислорода растений.

В связи с этим, актуальность метаболического профилирования растений, неустойчивых к гипоксии, и сопоставление метаболомов растений, различающихся по устойчивости к действию данного стрессора, не вызывает сомнений. Нам представляется перспективным сравнение метаболических профилей близкородственных видов растений мезофитов и гидрофитов, различающихся по устойчивости к затоплению и произрастающих на одной территории в разных биотопах, для выявления изменений метаболома, отличающих по-разному адаптированные растения. Знание характерных «отпечатков метаболических пальцев» устойчивых и неустойчивых растений можно использовать для диагностики устойчивости к дефициту кислорода у растений, что представляет интерес для селекционеров и агробиотехнологов.

Ранее мы провели метаболическое профилирование трех видов кипрея: мезофитного кипрея (иван-чая) узколистного [*Epilobium angustifolium* L. = *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop.] и двух гидрофитов, кипрея волосистого (*E. hirsutum* L.) и кипрея болотного (*E. palustre* L.) [22]. В профиле мезофита были обнаружены высокие уровни сахаров. У гидрофитных кипреев метаболомы практически не отличались друг от друга и характеризовались типичным анаэробным ответом, заключающимся в накоплении аминокислот, дикарбоновых кислот и метаболитов гликолиза и молочнокислого брожения, что отражало стимуляцию у них анаэробного дыхания, азотного обмена и альтернативных путей реокисления НАД(Ф)Н. Тем не менее гидрофитные *E. hirsutum* и *E. palustre* относятся к секции *Epilobium*, а *E. angustifolium* — к секции *Chamaenerion*. Таким образом, выявленные различия метаболических профилей могли быть обусловлены не столько экологическими, сколько таксономическими различиями изученных видов [22].

Цель — сравнение метаболических профилей листьев четырех видов лютика, различающихся разной степенью и стратегиями устойчивости к кислородной недостаточности и принадлежащих к двум под родам рода *Ranunculus*,

для выявления характерных изменений метаболома, свойственных устойчивым к дефициту кислорода гидрофитным растениям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований

Объектами настоящего исследования являются представители рода лютик (*Ranunculus* L.) — одного из крупнейших родов цветковых растений, объединяющего, по последним оценкам, от 1616 [23] до 1723 [24] видов. В пределах этого обширного рода встречаются самые разнообразные представители, как эндемичные [лютик Лайолла, *Ranunculus lyallii* (A. Gray) Rydb.], так и космополитные (лютик ползучий, *R. repens* L.), занимающие огромное количество экологических ниш по всему земному шару. На территории бывшего СССР встречается около 160 видов лютика [25], из них 16 видов произрастают в Ленинградской области и Санкт-Петербурге [26]. Нами были исследованы листья четырех видов, относящихся к двум ключевым под родам: лютик длиннолистный (*R. lingua* L.) и лютик ядовитый (*R. sceleratus* L.) — представители под рода *Auricomus* Spach., а также лютик едкий (*R. acris* L.) и лютик ползучий (*R. repens* L.) — представители под рода *Ranunculus* [27]. Помимо филогенетического родства, выбранные для исследования виды различаются по экологическим предпочтениям и формируемым жизненным формам. Большая часть видов этого рода является многолетними поликарпическими травами, а их развитие так или иначе связано с увлажненными местообитаниями, такими как берега рек, озер, временных водоемов или даже гипно-осоковые и тростниковые болота [28]. Тем не менее некоторые виды развиваются как однолетние монокарпики (*R. sceleratus*) или могут предпочитать более сухие местообитания (*R. acris*) [29].

Растения собирали в парке «Сергиевка» и на прилегающей территории (Петродворцовый район Санкт-Петербурга). Координаты места сбора: *R. lingua* — 59°54'00,5"N 29°50'32,5"E, на маршевом тростниковом болоте по берегу Финского залива; *R. sceleratus* — 59°53'04,7"N 29°50'33,6"E, в воде дренажной канавы прилегающего к территории парка садоводства; *R. repens* — 59°52'53,9"N 29°50'05,0"E, временная лужа вдоль пешеходной дорожки у факультета прикладной математики — процессов управления СПбГУ; *R. acris* — 59°52'43,5" N 29°49'54,3"E, суходольный луг напротив входа в здание математико-механического факультета СПбГУ. Парк «Сергиевка» расположен вблизи Финского залива, что придает его климату черты морского. Главнейшим фактором климатообразования здесь является интенсивное движение воздушных масс, приводящее к частому выпадению дождей даже в зимний период. Самый холодный месяц — февраль, в течение которого среднесуточная температура опускается до -8,1 °C. Летом усиливается влияние западных ветров, которые

обуславливают значительную облачность и обильное выпадение осадков. Наиболее жаркий месяц — июль, среднесуточная температура 16–17 °С [28].

Для исследования гидрофитов собирали листья растений, произрастающих в подтопленной почве в непосредственной близости от водоема (*R. lingua* и *R. repens*) или частично погруженных в воду (*R. sceleratus*). Листья мезофильного *R. acris* собирали на сухоходном лугу, вне зоны подтопления. Образцы анализировали в 6 биологических повторностях, собирая их от разных растений. Отбирали листья одной генерации и примерно одного размера, не поврежденные патогенами и фитофагами. Образцы собирали в середине июля. На портативных электронных весах брали навеску листьев лютиков (200 мг), которую помещали в микропробирку и заливали 1 мл метанола прямо на месте сбора.

Пробоподготовка

В течение 1–2 ч образцы доставляли в лабораторию, где метанольный экстракт переливали в новую микропробирку, а остаток растительного материала измельчали в шаровой мельнице (Tissue Lyser LT, QIAGEN, Германия, 50 уд./с, 3 раза по 2 мин) с 1 мл метанола, проводили пробоподготовку, как описано нами ранее [22]. До анализа высушенные образцы хранили при –80 °С.

Далее осадок в микропробирке растворяли в 100 мкл пиридина, содержащего внутренний стандарт (C₂₃, трикозан), затем добавляли 100 мкл силилирующего агента [1 % раствор триметилхлорсилана в бис(триметилсил)–N,O-трифторацетамиде, Sigma, США] и дериватизировали пробы на термошейкере TS-100C (BioSan, Латвия) при 800 об./мин, 90 °С в течение 20 мин.

Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией

Для ГХ–МС использовали газовый хроматограф Agilent 5860 с автоматической системой ввода проб Agilent 7893 под контролем программного обеспечения MassHunter (Agilent Technologies, США). Ввод проб осуществляли в режиме без деления потока, объем вводимой пробы 0,5 мкл. Разделение проводили на капиллярной колонке Agilent VF-5MS (длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм, Agilent Technologies). Газом-носителем служил гелий (постоянный поток 1 мл/мин, температура испарителя 250 °С). Температурный режим колонки: начальная температура 70 °С, далее — линейное повышение со скоростью 6 °С/мин до 320 °С [30]. Хроматограммы регистрировали с помощью масс-селективного детектора Agilent 5975. Диапазон масс: 50–800 m/z. Температура источника ионов 230 °С, квадрупольного фильтра масс — 150 °С. Исследования проводили на хроматографическом оборудовании Ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Интерпретация результатов ГХ–МС

Хроматограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения PARADISE [31] в сочетании с NIST MS Search (National Institute of Standards and Technology, NIST, США). Для деконволюции и идентификации метаболитов использовали AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST, США). Соединения идентифицировали по полученным масс-спектрам и индексам удерживания Ковача с использованием библиотек NIST2020 (США), Golm Metabolome Database (GMD, Германия) [32] и собственной библиотеки Лаборатории аналитической фитохимии Ботанического института РАН (Санкт-Петербург, Россия). Пик учитывали, когда коэффициент соответствия был >800. Индексы удерживания определяли путем калибровки с использованием насыщенных углеводов.

Статистический анализ

Анализ метаболомных данных проведен с использованием R 4.3.1 «Beagle Scouts» [33]. Данные нормализованы по выборочной медиане, логарифмированы и автомасштабированы. Если соединение не было обнаружено в конкретном образце, но присутствовало в остальных повторностях, это считалось технической ошибкой, и проводилась импутация с помощью метода KNN (к-ближайших соседей) пакета impute [34]. Тепловые карты строили с помощью ComplexHeatmap [35]. Метод Random Forest (RF) выполняли в randomForest [36]. Точность среднего уменьшения (Mean Decrease Accuracy, MDA) использовали для определения вклада признака в разницу классов. PCA (англ. Principal Component Analysis, метод главных компонент) проводили с помощью pcaMethods [37]. Диаграмму филогенетических взаимоотношений видов лютиков по материалам статьи [27] строили в программе Icytree [38]. Метод проекций на латентные структуры для дискриминационного анализа (PLS-DA) выполняли с помощью roppls [39]. Для анализа обогащения наборов метаболитов (metabolite set enrichment analysis, MSEA) применяли U-тест из пакета tmod [40]. Наборы метаболитов для метаболитных путей были загружены из базы данных KEGG [41] с использованием KEGGREST [42]. В качестве референсного организма использовали *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Список метаболитов, относящихся к различным биохимическим путям, корректировали вручную, поскольку для некоторых метаболитов были добавлены обязательные необходимые пути. Соединения, идентифицированные до класса (гексоза, дисахарид и др.), помещали в соответствующие пути.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью ГХ–МС нами было проведено профилирование метаболитов листьев четырех видов лютиков: *Ranunculus acris* (мезофит), *R. lingua*, *R. repens* и *R. sceleratus* (гидрофиты). Полученные метаболитные

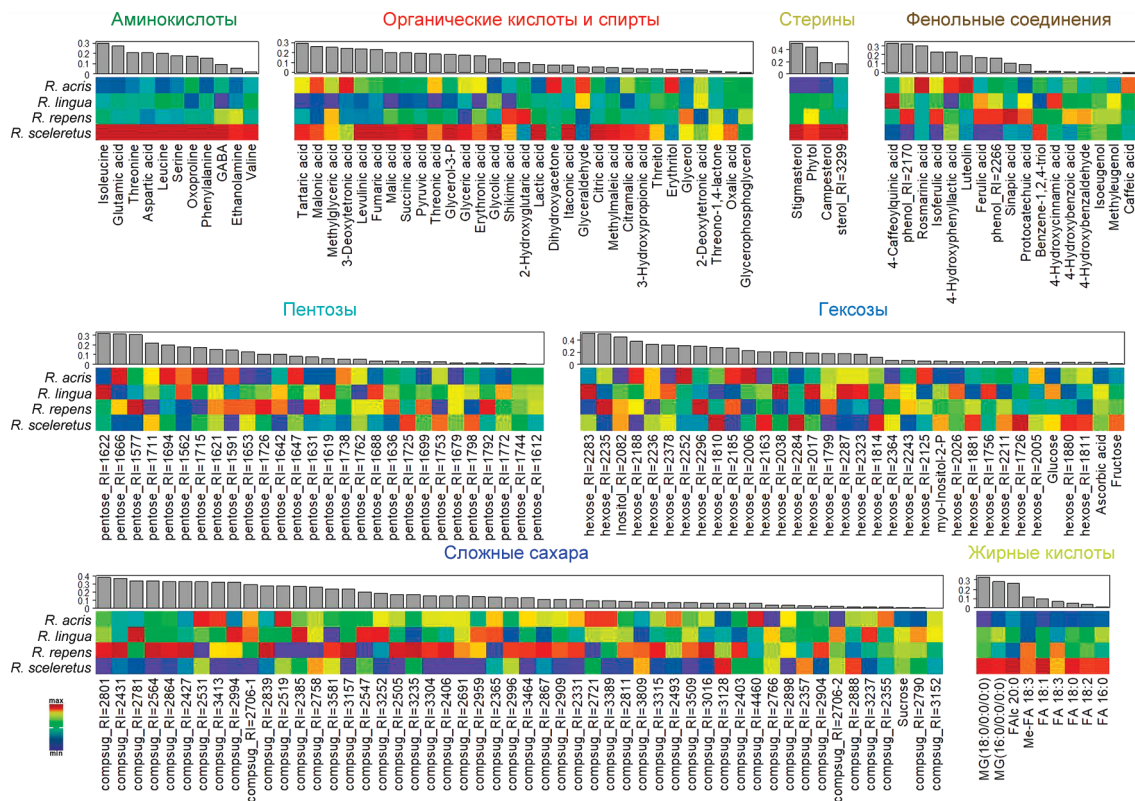


Рис. 1. Тепловая карта среднего нормализованного содержания идентифицированных метаболитов в листьях лютиков. Столбчатые диаграммы — Mean Decrease Accuracy из Random Forest. В названиях метаболитов: RI — индекс удерживания, compsig — сложные сахара или молекулы с сахарными частями, FA — жирная кислота, MG — моноацилглицерин

Fig. 1. Heatmap of mean normalized content identified metabolites. Barplots — Mean Decrease Accuracy from Random Forest. In metabolite names: RI — retention index, compsig — complex sugars or molecules with sugar parts, FA — fatty acid, MG — monoacylglycerol

профили включали около 360 соединений, из которых по базам данных было идентифицировано 74 индивидуальных соединений; еще для 109 соединений был определен класс (рис. 1). Результаты представлены в форме тепловой карты, совмещенной со столбчатыми диаграммами MDA (Mean Decrease Accuracy,) из классификации Random Forest. Наиболее широко в профилях были представлены сахара и их производные (114), в том числе пентозы (28), гексозы (34) и олигосахариды (52). Было также обнаружено 10 аминокислот (7 протеиногенных), 23 карбоновые кислоты, включая интермедиаты гликолиза (пируват), брожения (лактат) и цикла Кребса (цитрат, сукцинат, фумарат и малат), а также 6 свободных жирных кислот и ацилглицеринов. Стерины были представлены всего тремя молекулами. Удалось обнаружить 17 вторичных соединений, представленных различными фенолами.

На теплокарте видно, что наиболее своеобразными и отличными друг от друга были метаболомные профили гидрофитного *R. sceleratus* и мезофитного *R. acris* (рис. 1). Листья произрастающего в воде *R. sceleratus* содержали больше всего аминокислот, карбоксилатов, жирных кислот и стерина, тогда как уровни дисахаридов и фенольных соединений были понижены. Важно, что среди аккумулируемых *R. sceleratus* метаболитов присутствовали типичные представители анаэробного

метаболизма — интермедиаты гликолиза (глицерат и пируват) и брожений (лактат), карбоксилаты цикла Кребса (цитрат, сукцинат, фумарат и малат), аминокислоты, связанные с гликолизом (валлин, лейцин, серин и фенилаланин), а также ГАМК, глутамат и оксопролин (рис. 1). Мезофитный *R. acris* характеризовался наименьшей представленностью аминокислот, жирных кислот и стерина среди исследованных нами видов. *R. lingua* и *R. repens*, так же как и *R. sceleratus*, собранные в гидрофитных местообитаниях, по метаболитному профилю занимали промежуточное положение между *R. sceleratus* и *R. acris*. Как видно на теплокарте, в метаболоме *R. repens* были более представлены пентозы, сложные сахара и фенольные соединения, а профиль *R. lingua* отличался пониженным уровнем органических кислот и спиртов (рис. 1).

Для определения общих закономерностей в сходствах профилей мы представили их в пространстве меньшей размерности с использованием метода PCA. Профили метаболитов четко группировались согласно видовой принадлежности (рис. 2, a). Профили метаболитов *R. sceleratus* показали наибольшее своеобразие, они отличались от остальных по ГК1 (главная компонента 1), объясняющей 30 % дисперсии. Образцы *R. lingua* отделялись от *R. repens* и *R. acris* вдоль ГК2 (20,8 %). Последние, в свою очередь, расходились по ГК3 (19,1 %) (рис. 2, a). Затем мы провели иерархический

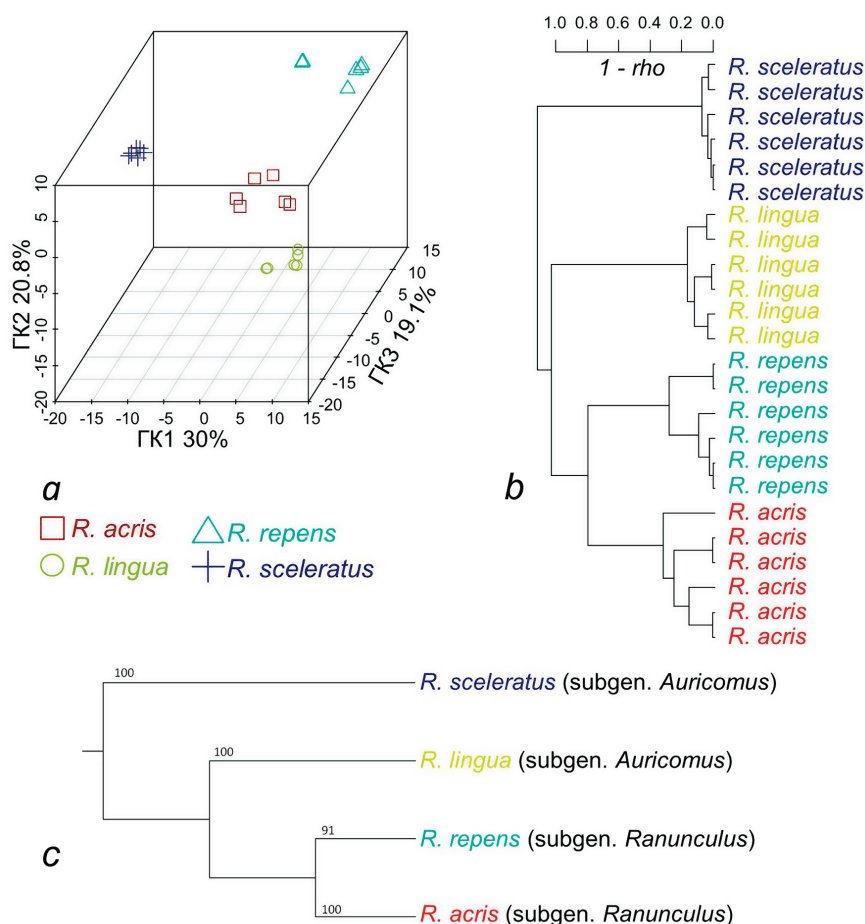


Рис. 2. Анализ без обучения профилей метаболитов четырех видов *Ranunculus*: *a* — графики счетов методом главных компонент (ГК); *b* — дендрограмма иерархической кластеризации метаболитических профилей, с расстоянием Пирсона (1 – ρ), агломерация методом Уорда; *c* — диаграмма филогенетических взаимоотношений четырех исследованных видов рода *Ranunculus* (по: [27], с изменениями). Построена на основе анализа методом максимальной парсимонии с использованием ядерного (ITS-область ядерной рибосомной ДНК) и двух хлоропластных маркеров (*matK/trnK*)

Fig. 2. Unsupervised analysis of metabolite profiles from four *Ranunculus* species: *a* — PCA score plots; *b* — dendrogram of hierarchical clustering of metabolic profiles, with Pearson distance (1 – ρ), Ward method; *c* — dendrogram of the phylogenetic relationships of studied *Ranunculus* species of the combined plastid and ITS dataset based on Maximum Parsimony analyses (after: [27], with modifications)

кластерный анализ с использованием дистанции Спирмена (1 – ρ , где ρ — коэффициент корреляции Спирмена). Такой подход также выявил своеобразие метаболомов *R. sceleratus*, которые кластеризовались в отдельную ветвь на дендрограмме (рис. 2, *b*). Далее профили *R. lingua* отделялись от *R. repens* и *R. acris*, которые и на дендрограмме также расходились последними.

Таким образом, на уровне метаболома гидрофитный *R. sceleratus*, произрастающий частично погруженным в воду, сильно отличался от остальных видов, причем как от *R. lingua* и *R. repens*, являющихся гидрофитами, так и от мезофитного *R. acris*. Данные кластерного анализа показали близость гидрофитного *R. repens* и мезофитного *R. acris*.

Для выявления метаболитов, накапливающихся в разных количествах у мезофита и гидрофитов, мы применили дискриминантный анализ методом проекции на латентные структуры PLS-DA. Построенная PLS-DA модель включала три предиктивные компоненты, $Q^2Y = 0,914$.

На рис. 3 представлен график счетов, сходный с таковым из PCA. Под ним расположен график нагрузок. Если положение метаболита на графике нагрузок соответствует положению образцов на графике счетов, то его накопление выше в соответствующих образцах. Расхождение *R. sceleratus* и других видов было связано с p_1 (предиктивная компонента 1), объясняющей 29,9 % дисперсии (рис. 3, *a*). Как видно из рисунка нагрузок (рис. 3, *b*) и анализа обогащения (MSEA, рис. 3, *c*) с p_1 был связан широкий репертуар дифференциально накапливающихся метаболитов, включая карбоксилаты, аминокислоты и жирные кислоты, стеринны, которые *R. sceleratus* аккумулировал в большем количестве. В то время как три других вида превосходили его по накоплению сахаров и вторичных соединений.

С p_2 (20,8 % дисперсии) были связаны отличия *R. lingua* от *R. repens* и *R. acris*. Как показывают нагрузки (рис. 3, *b*) и результаты MSEA (рис. 3, *c*), эти различия были сфокусированы в группе спиртов и органических кислот, которые

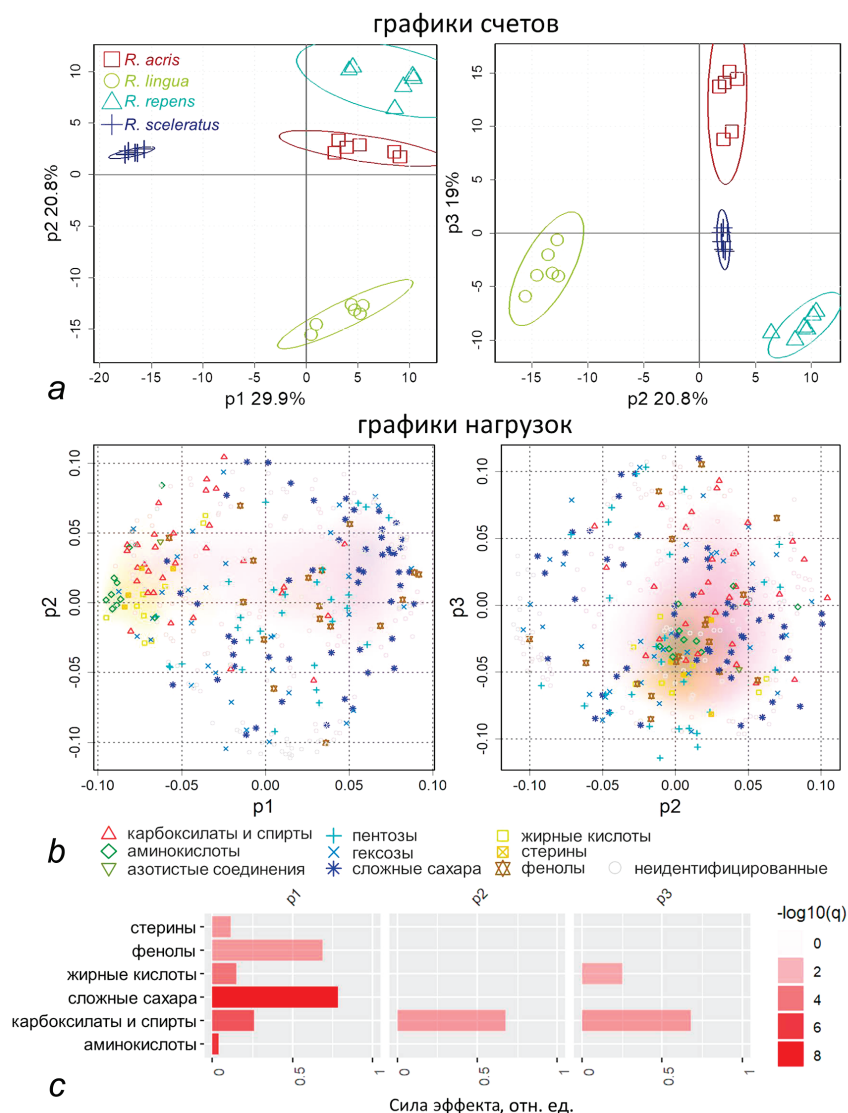


Рис. 3. Классификация четырех видов *Ranunculus* по результатам анализа PLS-DA: *a* — график счетов PLS-DA моделей; *b* — график нагрузок PLS-DA моделей, символы и цвета соответствуют классам веществ; *c* — анализ обогащения набора метаболитов (*U*-тест) по нагрузкам первых трех компонентов PLS-DA моделей и наборов метаболитов, представляющих химические группы. *q* — Уровень ложноположительных результатов

Fig. 3. PLS-DA classification of four *Ranunculus* species: *a* — PLS-DA score plots; *b* — PLS-DA loading plots, colors and symbols correspond to chemical classes; *c* — metabolite set enrichment analysis (*U*-test) on loadings of first three components PLS-DA models and sets of metabolites representing chemical groups. *q* — False discovery rate

показывали тренд к меньшему накоплению у *R. lingua*. Среди дифференциально накапливающихся метаболитов, отличающих *R. lingua* от других видов, присутствовали и соединения других классов, аминокислоты (ГАМК и оксопролин), ряд жирных кислот, фенолов и сахаров.

Различия в профилях метаболитов, характеризующие расхождение *R. repens* и *R. acris*, были связаны с *p3* (19 % дисперсии) и затрагивали преимущественно такие метаболиты, как пентозы, жирные кислоты и карбоксилаты (рис. 3). По результатам MSEA (рис. 3, *c*), различия мезофитного *R. acris* и гидрофитного *R. lingua* были связаны преимущественно с органическими и жирными кислотами. Важно, что по этой компоненте (*p3*) все гидрофитные лютики отличались от мезофита. *R. acris* превосходил *R. repens* и другие виды по уровню ряда *C₄* соединений,

таких как дезокситетраоновая кислота, эритритол, тартрат (за исключением *R. sceleratus*, рис. 1, 3). Для *R. acris* были свойственны относительно высокие уровни глицеральдегида, диоксиацетона, глицерата и малоната. Нужно отметить, что *R. acris* и *R. lingua* накапливали меньше шикимата по сравнению с двумя другими видами, причем *R. acris* отличался пониженным уровнем гидрофобных соединений — жирных кислот и стеринов (рис. 1, 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Имеющиеся в научной литературе немногочисленные данные о метаболическом профилировании лютиков охватывают в первую очередь целевую детекцию вторичных метаболитов — ранункулина [43], аминов и фенольных

соединений [44]. Ряд исследований посвящен изучению метаболомов листьев и корневых декоративного лютика азиатского (*R. asiaticus*) при яровизации, прорастании, цветении, разном фотопериоде и интенсивности света [45–47]. Только одна публикация посвящена проблемам экологической метаболомики травянистых растений в арктической тундре Исландии при действии на них геотермальной активности [48]. Повышение температуры почвы вызывало изменение метаболомов, хотя у *R. acris* это происходило в меньшей степени, чем у злака полевицы тонкой (*Agrostis capillaris* L.). Повышение температуры на 5–15 °C приводило к аккумуляции ряда углеводов, аминокислот, карбоксилатов и вторичных соединений, фенолов и терпенов в листьях *R. acris*. Большинство детектированных метаболитов было вовлечено в адаптацию к повышенной температуре [48].

В нашем эксперименте с помощью ГХ-МС было проведено метаболомное профилирование листьев мезофитного *R. acris* и гидрофитных *R. lingua*, *R. repens* и *R. sceleratus*, собранных в естественных местах их обитания. Профили всех четырех изученных видов лютиков отличались друг от друга по результатам всех проведенных анализов методами мультивариантной статистики, как с применением обучения, так и без него (рис. 1–3). Гидрофитный *R. sceleratus* показал наибольшее своеобразие метаболома, который кластеризовался по результатам иерархического кластерного анализа отдельно от остальных. Далее, ближе всех к *R. sceleratus* располагался *R. lingua*, а затем — *R. repens* и *R. acris*, которые на дендрограмме группировались вместе (рис. 2, b). Весьма любопытно, что результаты кластеризации по данным метаболомного профилирования полностью совпали с дендрограммой филогенетических взаимоотношений исследованных нами видов рода *Ranunculus* (рис. 2, c), построенной на основе анализа объединенного набора маркеров пластид и ядерного ITS (Internal Transcribed Spacer, внутренний транскрибируемый спейсер), а именно — ITS-области ядерной рибосомной ДНК и двух хлоропластных маркеров (*matK/trnK*), на основе анализа максимальной парсимонии (maximum parsimony) [27]. Следовательно, обнаруженные нами различия в метаболомических профилях изученных видов обусловлены в том числе и видовыми различиями. Виды *R. repens* и *R. acris*, входящие в подрод *Ranunculus*, кластеризовались вместе как по молекулярно-генетическим, так и метаболомическим маркерам, так же как и виды *R. lingua* и по *R. sceleratus*, принадлежащие подроду *Auricomus* (рис. 2, b, c). Таким образом, профилирование центрального метаболома позволяет находить родственные связи и наряду с классическими методами вычислительной филогенетики, использующей молекулярно-генетические методы, может быть востребовано при построении филогенетических дендрограмм. Следует заметить, что в предшествующих хемотаксономических исследованиях изучали преимущественно вторичные метаболиты.

Ранее мы обнаружили существенные различия между метаболомическими профилями листьев мезофитного *E. angustifolium* и гидрофитных *E. hirsutum* и *E. palustre*, причем метаболомы гидрофитных кипреев практически не отличались друг от друга. Было высказано предположение, что выявленные различия могли быть обусловлены не только экологическими, но и таксономическими различиями изученных видов [22]. В настоящем исследовании характерные для гидрофитных кипреев анаэробные «отпечатки метаболомических пальцев» были наиболее полно обнаружены только у *R. sceleratus*, образцы листьев которого собирали у произрастающих погруженными в воду растений. Так же как и *E. hirsutum* и *E. palustre* [22], *R. sceleratus* характеризовался пониженным уровнем олигосахаридов и аккумулировал интермедиаты гликолиза (глицерат и пируват) и брожений (лактат), органические кислоты цикла Кребса (цитрат, сукцинат, фумарат и малат), аминокислоты, связанные с гликолизом (валин, лейцин, серин и фенилаланин), а также ГАМК и глутамат (рис. 1, 3), что отражает стимуляцию у него анаэробного дыхания, азотного метаболизма и альтернативных путей реокисления НАД(Ф)Н [7, 20, 22]. Об активации аноплетротических путей окисления пиридинных динуклеотидов свидетельствует также повышение уровня глицерина, шикимата и стимуляция липидного обмена (рис. 1). Кроме того, в листьях *R. sceleratus* накапливались малонат и оксопролин, что может быть следствием усиливающихся при действии затопления окислительных повреждений липидов (аккумуляция малоната, формирующегося из малонового диальдегида), глутатиона и белков (оксопролин) [7, 49–51]. У мезофитного *R. acris* метаболом наиболее сильно отличался от такового у *R. sceleratus* (рис. 1; 2, b). Метаболиты, уровни которых повышались у гидрофита (аминокислоты, жирные кислоты и стерин), были понижены у мезофита, в то время как мезофит, в отличие от *R. sceleratus*, содержал больше сахаров (пентоз и олигосахаридов) и фенольных соединений. Метаболитные профили двух других гидрофитных лютиков *R. lingua* и *R. repens* занимали промежуточное положение между *R. acris* и *R. sceleratus* (рис. 2). В целом, различия между гидрофитами и мезофитами затрагивали изменение уровней карбоксилатов и гидрофобных соединений (рис. 3), причем *R. repens* накапливал большее количество метаболитов, характерных для устойчивых к гипоксии растений [аминокислот (в том числе ГАМК), карбоксилатов (в том числе лактата, малата, сукцината и шикимата), липидов, стерин и глицерина (рис. 1)]. *R. lingua* отличался меньшим уровнем содержания сахаров и фенолов по сравнению с *R. repens* и меньшим уровнем содержания аминокислот, карбоксилатов и гидрофобных соединений по сравнению с *R. sceleratus* (рис. 1). Исследованные нами гидрофитные виды лютиков имеют практически идентичные экологические ниши: они произрастают по заболоченным лугам, в поймах рек, по берегам водоемов и болотам [29]. *R. repens* и *R. sceleratus* также

могут расти в увлажненных местах по придорожным канавам, на пустырях, в садах и огородах, по рудеральным местообитаниям [29]. С другой стороны, между ними есть целый ряд существенных различий. *R. lingua* — высокое (до 1,5 м) многолетнее растение с прямым полым стеблем и корневищеобразными подземными побегами, типичный гелофит [29]. *R. repens* так же представляет собой многолетнее травянистое растение со стелющимся, укореняющимся в узлах стеблем (до 0,5 м длиной) и коротким ветвистым корневищем [29]. *R. sceleratus* — однолетнее травянистое растение со стеблем до 0,5 м высотой. Более того, этот вид отличается от остальных исследованных гидрофитов стратегией адаптации к дефициту кислорода. *R. sceleratus* обладает хорошо развитой конститутивной аэренхимой, а при затоплении стимулирует рост осевых органов, междоузлий стебля и черешков листьев [52], то есть демонстрирует стратегию избегания затопления (low oxygen escape syndrome, LOES) [7, 10, 20]. *R. repens* обладает лизигенной аэренхимой, а при полном затоплении, которого не было в нашем эксперименте, у него стимулируется в первую очередь не рост, а метаболические адаптации, включая подводный фотосинтез, гликолиз и брожения [52], то есть для него характерна стратегия покоя (low oxygen quiescence syndrome, LOQS) [7, 10, 20].

Важно, что выращивание гидрофитного рдеста *P. anguillanus* в условиях усиливающейся кислородной недостаточности (нормоксия → гипоксия → аноксия) проводило к последовательным перестройкам метаболизма на анаэробный тип [19]. Соответственно, метаболический ответ многолетних *R. repens* и *R. lingua*, произрастающих на затопленных почвах, был не таким интенсивным, как у однолетнего *R. sceleratus*, растущего в условиях полного затопления. Незначительные отличия метаболических профилей у гидрофитных *E. hirsutum* и *E. palustre* [22] также могли быть связаны с тем, что они произрастали в одинаковых условиях затопления.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что различия метаболических профилей гидрофитных видов лютика обусловлены генетическими детерминантами (жизненная форма и стратегия адаптации), экологической нишей (биотоп) и непосредственным действием стрессора (затопление). Для подтверждения данного вывода в дальнейшем необходимо провести сравнение метаболизма близкородственных гидрофитных и мезофитных растений для большего числа видов и исследовать воздействие кислородного голодания на метаболизм гидрофитов и мезофитов в лабораторных экспериментах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. Исследования выполнены с использованием оборудования Ресурсного центра Санкт-Петербургского

государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и посвящаются 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: П.Д. Смирнов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, написание текста, внесение окончательной правки; Р.К. Пузанский — хроматографическое исследование, анализ полученных данных, написание текста; С.А. Ванисов, М.Д. Дубровский — сбор и обработка материалов; А.Л. Шаварда — хроматографическое исследование, анализ полученных данных; М.Ф. Шишова — анализ полученных данных, обзор литературы; В.В. Емельянов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, хроматографическое исследование, анализ полученных данных, написание текста, обзор литературы, внесение окончательной правки, привлечение финансирования.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00484, <https://rscf.ru/project/22-24-00484/>).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgments. The research was performed using equipment of the Research Park “Center for Molecular and Cell Technologies” at Saint Petersburg State University, and the paper is dedicated to the 300th anniversary of St. Petersburg State University.

Authors' contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the study. Personal contribution of the authors: P.D. Smirnov — experimental design, collecting and preparation of samples, writing the main part of the text, making final edits; R.K. Puzanskiy — GC-MS, data analysis, writing the main part of the text; S.A. Vanisov, M.D. Dubrovskiy — collecting and preparation of samples; A.L. Shavarda — GC-MS, data analysis; M.F. Shishova — data analysis, literature review, making final edits; V.V. Yemelyanov — experimental design, collecting and preparation of samples, GC-MS, data analysis, writing the main part of the text, literature review, making final edits, funding acquisition.

Funding source. This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-00484, <https://rscf.ru/en/project/22-24-00484/>.

Competing interests. The authors declare no conflict of interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dalgliesh C.E., Horning E.C., Horning M.G., et al. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts // *Biochem J.* 1966. Vol. 101, No. 3. P. 792–810. DOI: 10.1042/bj1010792
2. Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool («Metabolome») analysis // *J Bacteriol.* 1998. Vol. 180, No. 19. P. 5109–5116. DOI: 10.1128/jb.180.19.5109-5116.1998
3. Holmes E., Wilson I.D., Nicholson J.K. Metabolic phenotyping in health and disease // *Cell.* 2008. Vol. 134, No. 5. P. 714–717. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.026
4. Sauter H., Lauer M., Fritsch H. Metabolic profiling of plants a new diagnostic technique // *ACS Symp Ser.* 1991. Vol. 443. P. 288–299. DOI: 10.1021/bk-1991-0443.ch024
5. Ghatak A., Chaturvedi P., Weckwerth W. Metabolomics in plant stress physiology. In: *Plant genetics and molecular biology. Advances in biochemical engineering/biotechnology.* Vol. 164 / Varshney R., Pandey M., Chitikineni A., editors. Springer, Cham, 2018. P. 187–236. DOI: 10.1007/10_2017_55
6. Xu Y., Fu X. Reprogramming of plant central metabolism in response to abiotic stresses: A metabolomics view // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, No. 10. ID 5716. DOI: 10.3390/ijms23105716
7. Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University // *Biol Commun.* 2018. Vol. 63, No. 1. P. 17–31. DOI: 10.21638/spbu03.2018.104
8. Fukao T., Barrera-Figueroa B.E., Juntawong P., Peña-Castro J.M. Submergence and waterlogging stress in plants: A review highlighting research opportunities and understudied aspects // *Front Plant Sci.* 2019. Vol. 10. ID 340. DOI: 10.3389/fpls.2019.00340
9. Dennis E.S., Dolferus R., Ellis M., et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants // *J Exp Bot.* 2000. Vol. 51, No. 342. P. 89–97. DOI: 10.1093/jexbot/51.342.89
10. Bailey-Serres J., Voisenek L.A.C.J. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity // *Annu Rev Plant Biol.* 2008. Vol. 59. P. 313–339. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752
11. van Dongen J.T., Frohlich A., Ramirez-Aguilar S.J., et al. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants // *Ann Bot.* 2009. Vol. 103, No. 2. P. 269–280. DOI: 10.1093/aob/mcn126
12. Rocha M., Licausi F., Araujo W.L., et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus* // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 152, No. 3. P. 1501–1513. DOI: 10.1104/pp.109.150045
13. Shingaki-Wells R.N., Huang S., Taylor N.L., et al. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance // *Plant Physiol.* 2011. Vol. 156, No. 4. P. 1706–1724. DOI: 10.1104/pp.111.175570
14. Locke A.M., Barding G.A. Jr., Sathnur S., et al. Rice *SUB1A* constrains remodelling of the transcriptome and metabolome during submergence to facilitate post-submergence recovery // *Plant Cell Environ.* 2018. Vol. 41, No. 4. P. 721–736. DOI: 10.1111/pce.13094
15. Herzog M., Fukao T., Winkel A., et al. Physiology, gene expression, and metabolome of two wheat cultivars with contrasting submergence tolerance // *Plant Cell Environ.* 2018. Vol. 41, No. 7. P. 1632–1644. DOI: 10.1111/pce.13211
16. Andrzejczak O.A., Havelund J.F., Wang W.-Q., et al. The hypoxic proteome and metabolome of barley (*Hordeum vulgare* L.) with and without phytohemoglobin priming // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, No. 4. ID 1546. DOI: 10.3390/ijms21041546
17. Antonio C., Pöpke C., Rocha M., et al. Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 170, No. 1. P. 43–56. DOI: 10.1104/pp.15.00266
18. Hasler-Sheetal H., Fagner L., Holmer M., Weckwerth W. Diurnal effects of anoxia on the metabolome of the seagrass *Zostera marina* // *Metabolomics.* 2015. Vol. 11, No. 5. P. 1208–1218. DOI: 10.1007/s11306-015-0776-9
19. Parveen M., Miyagi A., Kawai-Yamada M., et al. Metabolic and biochemical responses of *Potamogeton anguillanus* Koidz. (Potamogetonaceae) to low oxygen conditions // *J Plant Physiol.* 2019. Vol. 232. P. 171–179. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.023
20. Yemelyanov V.V., Puzanskiy R.K., Shishova M.F. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, No. 22. ID 16222. DOI: 10.3390/ijms242216222
21. Jethva J., Schmidt R.R., Sauter M., Selinski J. Try or die: Dynamics of plant respiration and how to survive low oxygen conditions // *Plants.* 2022. Vol. 11, No. 2. ID 205. DOI: 10.3390/plants11020205
22. Пузанский Р.К., Смирнов П.Д., Ванисов С.А., и др. Метаболическое профилирование листьев трех видов кипрея // *Экологическая генетика.* 2022. Т. 20, № 4. С. 279–293. DOI: 10.17816/ecogen114743
23. wfoplantlist.org [Электронный ресурс]. The WFO Plant list. Режим доступа: <https://wfoplantlist.org/plant-list/>. Дата обращения: 15.11.2023
24. catalogueoflife.org [Электронный ресурс]. The catalogue of life Режим доступа: <https://www.catalogueoflife.org/>. Дата обращения: 15.11.2023.
25. Бобров Е.Г., Булавкина А.А., Комаров В.Л., и др. Флора СССР. Т. 7. Москва: Издательство АН СССР, 1937. 793 с.
26. Аверьянов Л.В., Буданцев А.Л., Гельтман Д.В., и др. Иллюстрированный определитель растений Ленинградской области / под ред. А.Л. Буданцева, Г.П. Яковлева. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 799 с.
27. Emadzade K., Gehrke B., Linder H.P., Hörandl E. The biogeographical history of the cosmopolitan genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) in the temperate to meridional zones // *Mol Phylogenet Evol.* 2011. Vol. 58, No. 1. P. 4–21. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.002
28. Бахматова К.А., Васильева В.А., Вершинина О.М., и др. Парк Сергиевка — комплексный памятник природы. Санкт-Петербург: Типография ООО СПб СРП «Павел», 2005. 144 с.
29. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2014. 635 с.
30. Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Shavarda A.L., et al. Age- and organ-specific differences of potato (*Solanum phureja*) plants metabolome // *Russ J Plant Physiol.* 2018. Vol. 65, No. 6. P. 813–823. DOI: 10.1134/S1021443718060122
31. Johnsen L.G., Skou P.B., Khakimov B., Bro R. Gas chromatography — Mass spectrometry data processing made easy // *J Chromatogr A.* 2017. Vol. 1503. P. 57–64. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052

32. Hummel J., Selbig J., Walther D., Kopka J. The golm metabolome database: a database for GC-MS based metabolite profiling. In: *Metabolomics. Topics in current genetics*. Vol. 18 / Nielsen J., Jewett M.C., editors. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. P. 75–95. DOI: 10.1007/4735_2007_0229
33. r-project.org [Электронный ресурс]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. Режим доступа: <https://www.r-project.org/>. Дата обращения: 15.11.2023.
34. Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B., Chu G. impute: Imputation for microarray data. R package version 1.70.0. 2022. DOI: 10.18129/B9.bioc.impute
35. Gu Z. Complex heatmap visualization // *iMeta*. 2022. Vol. 1, No. 3. ID e43. DOI: 10.1002/imt2.43
36. Liaw A., Wiener M. Classification and regression by randomForest // *R News*. 2002. Vol. 2, No. 3. P. 18–22.
37. Stacklies W., Redestig H., Scholz M., et al. *pcaMethods* — a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data // *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23, No. 9. P. 1164–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm069
38. Vaughan T.G. IcyTree: Rapid browser-based visualization for phylogenetic trees and networks // *Bioinformatics*. 2017. Vol. 33, No. 15. P. 2392–2394. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx155
39. Thevenot E.A., Roux A., Xu Y., et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses // *J Proteome Res*. 2015. Vol. 14, No. 8. P. 3322–3335. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
40. Zyla J., Marczyk M., Domaszewska T., et al. Gene set enrichment for reproducible science: Comparison of CERNO and eight other algorithms // *Bioinformatics*. 2019. Vol. 35, No. 24. P. 5146–5154. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz447
41. Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y., et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes // *Nucleic Acids Res*. 2023. Vol. 51, No. D1. ID gkac963. DOI: 10.1093/nar/gkac963
42. Tenenbaum D., Maintainer B. KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). 2022. R package version 1.36.2. DOI: 10.18129/B9.bioc.KEGGREST
43. Michl J., Modarai M., Edwards S., Heinrich M. Metabolomic analysis of *Ranunculus* spp. as potential agents involved in the etiology of equine grass sickness // *J Agric Food Chem*. 2011. Vol. 59, No. 18. P. 10388–10393. DOI: 10.1021/jf201430k
44. Labarrere B., Prinzing A., Dorey T., et al. Variations of secondary metabolites among natural populations of sub-Antarctic *Ranunculus* species suggest functional redundancy and versatility // *Plants*. 2019. Vol. 8, No. 7. ID 234. DOI: 10.3390/plants8070234
45. Carillo P., Dell'Aversana E., Modarelli G.C., et al. Metabolic profile and performance responses of *Ranunculus asiaticus* L. hybrids as affected by light quality of photoperiodic lighting // *Front Plant Sci*. 2020. Vol. 11. ID 597823. DOI: 10.3389/fpls.2020.597823
46. Modarelli G.C., Arena C., Pesce G., et al. The role of light quality of photoperiodic lighting on photosynthesis, flowering and metabolic profiling in *Ranunculus asiaticus* L. // *Physiol Plant*. 2020. Vol. 170, No. 2. P. 187–201. DOI: 10.1111/ppl.13122
47. Fusco G.M., Carillo P., Nicastro R., et al. Metabolic profiling in tuberos roots of *Ranunculus asiaticus* L. as influenced by vernalization procedure // *Plants*. 2023. Vol. 12, No. 18. ID 3255. DOI: 10.3390/plants12183255
48. Gargallo-Garriga A., Ayala-Roque M., Sardans J., et al. Impact of soil warming on the plant metabolome of Icelandic grasslands // *Metabolites*. 2017. Vol. 7, No. 3. ID 44. DOI: 10.3390/metabo7030044
49. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review // *Ann Bot*. 2003. Vol. 91, No. 2. P. 179–194. DOI: 10.1093/aob/mcf118
50. Ohkama-Ohtsu N., Oikawa A., Zhao P., et al. A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2008. Vol. 148, No. 3. P. 1603–1613. DOI: 10.1104/pp.108.125716
51. Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms // *Russ J Plant Physiol*. 2020. Vol. 67, No. 1. P. 45–59. DOI: 10.1134/S1021443720010203
52. He J.B., Bögemann G.M., van de Steeg H.M., et al. Survival tactics of *Ranunculus* species in river floodplains // *Oecologia*. 1999. Vol. 118, No. 1. P. 1–8. DOI: 10.1007/s004420050696

REFERENCES

1. Dalgliesh CE, Horning EC, Horning MG, et al. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J*. 1966;101(3):792–810. DOI: 10.1042/bj1010792
2. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool (“Metabolome”) analysis. *J Bacteriol*. 1998;180(19):5109–5116. DOI: 10.1128/jb.180.19.5109-5116.1998
3. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*. 2008;134(5):714–717. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.026
4. Sauter H, Lauer M, Fritsch H. Metabolic profiling of plants a new diagnostic technique. *ACS Symp Ser*. 1991;443:288–299. DOI: 10.1021/bk-1991-0443.ch024
5. Ghatak A, Chaturvedi P, Weckwerth W. Metabolomics in plant stress physiology. Varshney R, Pandey M, Chitikineni A, editors. *Plant genetics and molecular biology. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Vol. 164. Springer, Cham, 2018. P. 187–236. DOI: 10.1007/10_2017_55
6. Xu Y, Fu X. Reprogramming of plant central metabolism in response to abiotic stresses: A metabolomics view. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10):5716. DOI: 10.3390/ijms23105716
7. Chirkova T, Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol Commun*. 2018;63(1):17–31. DOI: 10.21638/spbu03.2018.104
8. Fukao T, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM. Submergence and waterlogging stress in plants: A review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Front Plant Sci*. 2019;10:340. DOI: 10.3389/fpls.2019.00340
9. Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J Exp Bot*. 2000;51(342):89–97. DOI: 10.1093/jexbot/51.342.89
10. Bailey-Serres J, Voesenek LACJ. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:313–339. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752
11. van Dongen JT, Frohlich A, Ramirez-Aguilar SJ, et al. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases

- in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. *Ann Bot.* 2009;103(2):269–280. DOI: 10.1093/aob/mcn126
12. Rocha M, Licausi F, Araujo WL, et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicas*. *Plant Physiol.* 2010;152(3):1501–1513. DOI: 10.1104/pp.109.150045
13. Shingaki-Wells RN, Huang S, Taylor NL, et al. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. *Plant Physiol.* 2011;156(4):1706–1724. DOI: 10.1104/pp.111.175570
14. Locke AM, Barding GA Jr, Sathnur S, et al. Rice *SUB1A* constrains remodelling of the transcriptome and metabolome during submergence to facilitate post-submergence recovery. *Plant Cell Environ.* 2018;41(4):721–736. DOI: 10.1111/pce.13094
15. Herzog M, Fukao T, Winkel A, et al. Physiology, gene expression, and metabolome of two wheat cultivars with contrasting submergence tolerance. *Plant Cell Environ.* 2018;41(7):1632–1644. DOI: 10.1111/pce.13211
16. Andrzejczak OA, Havelund JF, Wang W-Q, et al. The hypoxic proteome and metabolome of barley (*Hordeum vulgare* L.) with and without phytohemoglobin priming. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1546. DOI: 10.3390/ijms21041546
17. Antonio C, Pöpke C, Rocha M, et al. Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution. *Plant Physiol.* 2016;170(1):43–56. DOI: 10.1104/pp.15.00266
18. Hasler-Sheetal H, Fragner L, Holmer M, Weckwerth W. Diurnal effects of anoxia on the metabolome of the seagrass *Zostera marina*. *Metabolomics.* 2015;11(5):1208–1218. DOI: 10.1007/s11306-015-0776-9
19. Parveen M, Miyagi A, Kawai-Yamada M, et al. Metabolic and biochemical responses of *Potamogeton anguillanus* Koidz. (Potamogetonaceae) to low oxygen conditions. *J Plant Physiol.* 2019;232:171–179. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.023
20. Yemelyanov VV, Puzanskiy RK, Shishova MF. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16222. DOI: 10.3390/ijms242216222
21. Jethva J, Schmidt RR, Sauter M, Selinski J. Try or die: Dynamics of plant respiration and how to survive low oxygen conditions. *Plants.* 2022;11(2):205. DOI: 10.3390/plants11020205
22. Puzanskiy RK, Smirnov PD, Vanisov SA, et al. Metabolite profiling of leaves of three *Epilobium* species. *Ecological genetics.* 2022;20(4):279–293. DOI: 10.17816/ecogen114743
23. wfoflantlist.org [Internet]. The WFO Plant list [cited 2023 Nov 15]. Available at: <https://wfoflantlist.org/plant-list/>
24. catalogueoflife.org [Internet]. The catalogue of life [cited 2023 Nov 15]. Available at: <https://www.catalogueoflife.org/>
25. Bobrov EG, Bulavkina AA, Komarov VL, et al. *Flora of the USSR. Vol. 7.* Moscow: Izdatel'stvo AN SSSR, 1937. 793 p. (In Russ.)
26. Averyanov LV, Budantsev AL, Geltman DV, et al. *Illustrated identifier of plants of the Leningrad region.* Budantsev AL, Yakovlev GP, editors. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2006. 799 p. (In Russ.)
27. Emadzade K, Gehrke B, Linder HP, Hörandl E. The biogeographical history of the cosmopolitan genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) in the temperate to meridional zones. *Mol Phylogenet Evol.* 2011;58(1):4–21. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.002
28. Bakhmatova KA, Vasilieva VA, Vershinina OM, et al. *Sergievka Park — a complex natural monument.* Saint Petersburg: Tipografiya OOO SPb SRP "Pavel", 2005. 144 p. (In Russ.)
29. Maevsky PF. *Flora of the middle zone of the European part of Russia. 11th ed.* Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2014. 635 p. (In Russ.)
30. Puzanskiy RK, Yemelyanov VV, Shavarda AL, et al. Age- and organ-specific differences of potato (*Solanum phureja*) plants metabolome. *Russ J Plant Physiol.* 2018;65(6):813–823. DOI: 10.1134/S1021443718060122
31. Johnsen LG, Skou PB, Khakimov B, Bro R. Gas chromatography — Mass spectrometry data processing made easy. *J Chromatogr A.* 2017;1503:57–64. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052
32. Hummel J, Selbig J, Walther D, Kopka J. The golm metabolome database: a database for GC-MS based metabolite profiling. In: Nielsen J, Jewett MC, editors. *Metabolomics. Topics in current genetics. Vol. 18.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. P. 75–95. DOI: 10.1007/4735_2007_0229
33. r-project.org [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023 [cited 2023 Nov 15]. Available at: <https://www.r-project.org/>
34. Hastie T, Tibshirani R, Narasimhan B, Chu G. *impute: Imputation for microarray data. R package version 1.70.0.* 2022. DOI: 10.18129/B9.bioc.impute
35. Gu Z. Complex heatmap visualization. *iMeta.* 2022;1(3):e43. DOI: 10.1002/imt2.43
36. Liaw A, Wiener M. Classification and regression by randomForest. *R News.* 2002;2(3):18–22.
37. Stacklies W, Redestig H, Scholz M, et al. *pcaMethods* — a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics.* 2007;23(9):1164–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm069
38. Vaughan TG. IcyTree: Rapid browser-based visualization for phylogenetic trees and networks. *Bioinformatics.* 2017;33(15):2392–2394. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx155
39. Thevenot EA, Roux A, Xu Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J Proteome Res.* 2015;14(8):3322–3335. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
40. Zyla J, Marczyk M, Domaszewska T, et al. Gene set enrichment for reproducible science: Comparison of CERO and eight other algorithms. *Bioinformatics.* 2019;35(24):5146–5154. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz447
41. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):gkac963. DOI: 10.1093/nar/gkac963
42. Tenenbaum D, Maintainer B. *KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).* 2022. *R package version 1.36.2.* DOI: 10.18129/B9.bioc.KEGGREST
43. Michl J, Modarai M, Edwards S, Heinrich M. Metabolomic analysis of *Ranunculus* spp. as potential agents involved in the etiology of equine grass sickness. *J Agric Food Chem.* 2011;59(18):10388–10393. DOI: 10.1021/jf201430k
44. Labarrere B, Prinzing A, Dorey T, et al. Variations of secondary metabolites among natural populations of sub-Antarctic *Ranunculus* species suggest functional redundancy and versatility. *Plants.* 2019;8(7):234. DOI: 10.3390/plants8070234
45. Carillo P, Dell'Aversana E, Modarelli GC, et al. Metabolic profile and performance responses of *Ranunculus asiaticus* L. hybrids as affected by light quality of photoperiodic lighting. *Front Plant Sci.* 2020;11:597823. DOI: 10.3389/fpls.2020.597823
46. Modarelli GC, Arena C, Pesce G, et al. The role of light quality of photoperiodic lighting on photosynthesis, flowering and meta-

bolic profiling in *Ranunculus asiaticus* L. *Physiol Plant*. 2020;170(2):187–201. DOI: 10.1111/ppl.13122

47. Fusco GM, Carillo P, Nicastro R, et al. Metabolic profiling in tuberos roots of *Ranunculus asiaticus* L. as influenced by vernalization procedure. *Plants*. 2023;12(18):3255. DOI: 10.3390/plants12183255

48. Gargallo-Garriga A, Ayala-Roque M, Sardans J, et al. Impact of soil warming on the plant metabolome of Icelandic grasslands. *Metabolites*. 2017;7(3):44. DOI: 10.3390/metabo7030044

49. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot*. 2003;91(2):179–194. DOI: 10.1093/aob/mcf118

50. Ohkama-Ohtsu N, Oikawa A, Zhao P, et al. A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2008;148(3):1603–1613. DOI: 10.1104/pp.108.125716.

51. Shikov AE, Chirkova TV, Yemelyanov VV. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms. *Russ J Plant Physiol*. 2020;67(1):45–59. DOI: 10.1134/S1021443720010203

52. He JB, Bögemann GM, van de Steeg HM, et al. Survival tactics of *Ranunculus* species in river floodplains. *Oecologia*. 1999;118(1):1–8. DOI: 10.1007/s004420050696

ОБ АВТОРАХ

Павел Дмитриевич Смирнов; ORCID: 0000-0002-4663-8398; eLibrary SPIN: 4273-1520; e-mail: p.d.smirnov@gmail.com

Роман Константинович Пузанский, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0002-5862-2676; eLibrary SPIN: 6399-2016; e-mail: puzansky@yandex.ru

Сергей Алексеевич Ванисов; e-mail: s.vanisov@mail.ru

Максим Дмитриевич Дубровский; e-mail: max.d10@mail.ru

Алексей Леонидович Шаварда, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0003-1778-2814; eLibrary SPIN: 5637-5122; e-mail: stachyopsis@gmail.com

Мария Федоровна Шишова, д-р биол. наук, профессор; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611; e-mail: mshishova@mail.ru

***Владислав Владимирович Емельянов**, канд. биол. наук, доцент; адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9; ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278; e-mail: bootika@mail.ru

AUTHORS' INFO

Pavel D. Smirnov; ORCID: 0000-0002-4663-8398; eLibrary SPIN: 4273-1520; e-mail: p.d.smirnov@gmail.com

Roman K. Puzanskiy, Cand. Sci (Biology); ORCID: 0000-0002-5862-2676; eLibrary SPIN: 6399-2016; e-mail: puzansky@yandex.ru

Sergey A. Vanisov; e-mail: s.vanisov@mail.ru

Maksim D. Dubrovskiy; e-mail: max.d10@mail.ru

Alexey L. Shavarda, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0003-1778-2814; eLibrary SPIN: 5637-5122; e-mail: stachyopsis@gmail.com

Maria F. Shishova, Dr. Sci. (Biology), Professor; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611; e-mail: mshishova@mail.ru

***Vladislav V. Yemelyanov**, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor; address: 7/9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278; e-mail: bootika@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author