

Статья посвящена 120-летию  
со дня рождения выдающегося российского генетика,  
академика Бориса Львовича Астаурова

## СКРИНИНГ И ТРАНСКРИПТОМНАЯ АКТИВНОСТЬ PR-ГЕНОВ И РЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРОРОСТКОВ *PINUS SYLVESTRIS L.* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *FUSARIUM SP.*

© 2025 г. Л. В. Можаровская

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001 Беларусь

e-mail: milamozh@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2025 г.

После доработки 26.02.2025 г.

Принято к публикации 13.03.2025 г.

В условиях инфицирования культурой микромицета *Fusarium sp.* для проростков *Pinus sylvestris* на основе транскриптомного анализа проведены скрининг и количественная оценка транскриптов защитных PR-генов, а также участвующих в регуляции клеточного цикла — CDK, CKS и циклина. В условиях биотического стресса установлено снижение транскрипционной активности генов регуляторов клеточного цикла при повышенной экспрессии PR-генов. Полученные результаты расширяют наши знания о генетической детерминации факторов устойчивости и оценки адаптационных особенностей ювенильных растений *P. sylvestris* к инфекционным заболеваниям.

**Ключевые слова:** транскриптом, PR-гены, регуляторы клеточного цикла, *Pinus sylvestris*, *Fusarium*

**DOI:** 10.31857/S0475145025010052, **EDN:** KVCZAT

### ВВЕДЕНИЕ

Система устойчивости древесных растений к инфекционным агентам включает конститутивно-заложенные физические, химические и молекулярные защитные механизмы. В процессе онтогенеза растений наиболее уязвимым состоянием является период перехода из одного онтогенетического состояния в другое, кроме того, для некоторых видов устойчивость, обусловленная морфологическими особенностями, может находиться в зависимости от зрелости (Кулагин, 2013; Develey-Riviere et al., 2007). При инфицировании генеративных древесных растений патогенным микроорганизмом необходимо преодолеть первичный уровень защиты — физический, который связан с анатомическим строением и формированием структур, продуцирующих защитные химические соединения (Keeling et al., 2006). Помимо конститутивно-заложенных физических и химических барьеров растения обладают индуцированной системой защиты. В ее основе лежит детекция специфических химических со-

единений микроорганизмов иммунными рецепторами растения и активация паттерн-активированного (PTI) и эффекторного иммунитета (ETI). Включение PTI и ETI приводит к генерации мобильного химического сигнала, распространяющегося в дистальные неинфицированные части растения, вызывая в свою очередь формирование системной приобретенной устойчивости (SAR). Ключевыми компонентами SAR являются многофункциональные PR-белки (с англ. pathogenesis-related proteins), которые могут входить в состав сигнальных систем, катализируя образование вторичных сигнальных молекул, характеризоваться антимикробными свойствами, вызывая повреждения клеточных стенок и цитоплазматических мембран патогенов. Среди генов, кодирующих PR-белки, относительно структурно-функциональной организации выделяют до 19 семейств (Islam, 2023). Молекулярные механизмы защиты имеют особое значение при формировании устойчивости у ювенильных растений. В отличие от генеративных растений, проявление защитных механизмов на ранних

этапах развития ограничено, что связано с анатомическими особенностями строения, а также преимущественным направлением внутренних ресурсов на интенсивный рост, поскольку зрелые органы более подготовлены к защите (Develey-Riviere et al., 2007). В то же время в условиях биотического стресса в результате активации адаптационного потенциала и защитных систем происходит угнетение клеточного цикла и, как следствие, наблюдается снижение деления клеток, что приводит к замедлению роста растений, а в ряде случаев и к запрограммированной гибели клеток (Qi et al., 2020). Клеточный цикл является строго регулируемым процессом, обеспечивающим точность репликации генетического материала с последующим его делением между двумя дочерними клетками. У растений, как и всех эукариотических организмов, контроль клеточного цикла осуществляется путем активации и взаимодействия мультисубъединичных комплексов, состоящих из каталитической циклинзависимой киназы (CDK) и регуляторной субъединицы циклинзависимой киназы (CKS) (Carneiro, 2021).

Проведение комплексных исследований с использованием молекулярно-генетического анализа на основе высокопроизводительного секвенирования, позволяющего получить сведения о генетической детерминации факторов устойчивости и оценки адаптационных особенностей растений к инфекционным заболеваниям, необходимо для разработки фундаментальных аспектов и конкретных селекционных мероприятий повышения устойчивости посадочного материала древесных растений. Основная сложность в исследовании генетических основ устойчивости *Pinus sylvestris* заключается в отсутствии аннотированного референсного генома, и исследования, направленные на идентификацию и структурно-функциональную аннотацию генов, ассоциированных с устойчивостью, являются актуальными.

Целью настоящего исследования являлся скрининг и оценка экспрессионной активности PR-генов и регуляторов клеточного цикла транскриптомов проростков *P. sylvestris*, выращенных в условиях заражения культурой микромицета *Fusarium sp.*

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В контролируемых условиях проводился посев и выращивание *P. sylvestris* при последующем заражении возбудителем инфекционного поле-

гания, культурой *Fusarium sp.* (NCBI GenBank: MW429282.1), с сохранением контрольного варианта без инфицирования. Условия культивирования растений: торфо-песчаный субстрат,  $T = 22^{\circ}\text{C}$ , создание инфекционного фона достигалось поэтапным внесением инокулюма гриба в субстрат (5 мг мицелия на  $100\text{ см}^2$  площади субстрата) перед посадкой семян, на 7-е и 14-е сутки после появления всходов. В процессе патогенеза были выделены устойчивая и восприимчивая (с признаками инфекционного полегания) группы растений. На 18-е сутки для каждой исследуемой группы (контрольной, устойчивой и восприимчивой) проводился отбор 15 индивидуальных растений. Для дальнейшего анализа использовали ткани корня и гипокотиля, при этом индивидуальные растения каждой группы объединяли в общий пул. Тотальную РНК получали с применением коммерческого набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и последующей обработкой DNase I и RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США). Для реакции обратной транскрипции матричной РНК с получением двухцепочечной кДНК использовали набор Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для транскриптомного анализа получали кДНК библиотеки: контрольной, устойчивой и восприимчивой групп растений. Создание библиотек кДНК (размер фрагмента  $\approx 200$  п.н.) и реакцию секвенирования выполняли с применением набора Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 и полупроводникового микрочипа Ion 314 Chip v2 на базе геномного анализатора Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США). Первоначальную обработку данных и оценку качества полученных последовательностей, осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения IonTorrent Suite v. 5.8 (Thermo Fisher Scientific, США). На основе автоматической фильтрации пороговый уровень качества полученных данных составлял  $Q \geq 20$ , что обеспечивает более чем 99% точность анализа. Сборку транскриптов генов и окончательную обработку информации проводили с использованием программного обеспечения Seqman NGen v.11 (DNASTAR, Израиль) и UGENE v. 1.29.0. (Unipro, Россия). Структурно-функциональную аннотацию транскриптомов проводили согласно анализу структурного сходства последовательностей в базе данных нуклеотидных последовательностей и консервативных структурно-функциональных доменов NCBI CDD с использованием Batch-CD Search Tool. Нормализацию уровней экспрессии генов

исследуемых транскриптомов рассчитывали относительно одного миллиона прочтений — RPM (от англ. reads per million, RPM — прочтений на миллион), полученные значения переводили в логарифм —  $\log_2(\text{RPM})$ . Анализ данных значений уровней экспрессии генов исследуемых транскриптомов проводился на основе применения описательной статистики, многомерного статистического анализа данных, непараметрических тестов Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни в пакете программ Statistica 10. Статистически значимыми считались отличия при  $p < 0.05$ . Визуализировали данные уровней экспрессии транскриптов на основе построения тепловых карт в программе SRplot.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего для исследуемых транскриптомов проростков *P. sylvestris* аннотировано 14 778 структурно-функциональных групп белков. Среди транскриптов генов, кодирующих PR-белки, согласно наличию консервативных структурно-функциональных доменов, идентифицированы транскрипты двенадцати семейств: цистеин богатых белков, ассоциированных с патогенезом (PR-1, CDD ID: cd05381); хитиназы (PR-3, cd00325; PR-11, cd02879); эндохитиназы, содержащих Varwin-домен (PR-4, pfam00967); тауматин-подобных белков (PR-5\_TLP-P, cd09217; PR-5\_TLP-PA, cd09218; PR-5\_T (тауматин), pfam00314); ингибиторов протеиназы II типа (PR-6, pfam02428); секреторных растительных пероксидазы III класса (PR-9, cd00693); гомологов Vet v 1 (основной аллерген пыльцы *Betula verrucosa*) с лиганд-связывающей активностью (PR-10, cd07816); дефензинов (PR-12, pfam00304); липид-транспортирующих белков (PR-14: неспецифические белки переносчики липидов 1-го типа (nsLTP1), cd01960; неспецифические белки переносчики липидов 2-го типа (nsLTP2), cd01959; белки, схожие с неспецифическими белками переносчиками липидов (nsLTP\_like), cd04660; белки — переносчики липидов 2-го типа (LTP2), pfam14368); основных секреторных белков BSP (PR-17, pfam04450); антимикробных пептидов — гомологов высокоосновного белка *Macadamia integrifolia* (MiAMP1) (PR-19, pfam09117). На основе RPM-анализа проведена количественная оценка экспрессии PR-генов транскриптомов устойчивой, восприимчивой и контрольной групп проростков *P. sylvestris*. Для установления различий между уровнями экспрессии транскриптов анализируемых групп генов проведен кластерный анализ методом евклидовых расстояний. Из пред-

ставленной тепловой карты с кластерным анализом (рис. 1) видно, что транскрипты PR-генов (PR-1, PR-3, PR-4, PR-5\_T, PR-5\_TLP-P, PR-6, PR-9, PR-10, PR-17) формируют общий кластер с повышенной функциональной активностью у восприимчивой группы проростков. Различия между анализируемыми транскриптомами значений  $\log_2(\text{RPM})$  данного кластера являлись статистически значимыми, и для восприимчивой группы варьировали от 9.07 (PR-1) до 13.15 (PR-3), при медиане 11.97 (интерквартильный размах Q1 и Q3 — 10.83 и 12.62), для транскриптомов контрольной и устойчивой групп были ниже и варьировали от 3.40 и 4.08 (PR-1) до 12.23 и 12.15 (PR-9) соответственно, при медиане группы контроля 7.96 (интерквартильный размах Q1 и Q3 — 6.99 и 10.09) и 9.37 (интерквартильный размах Q1 и Q3 — 8.31 и 10.52) устойчивой группы. Для транскриптома группы контроля отмечена повышенная экспрессия транскриптов генов трех PR-семейств: растительных хитиназ V класса (PR-11), дефензина (PR-12) и неспецифических белков переноса липидов 1-го и 2-го типов (PR-14). Наблюдаемая повышенная экспрессия данных транскриптов может быть, как конститутивно обусловлена (так, дефензины защищают растения на ранних этапах развития), так и связана с многофункциональностью PR-генов, их участием помимо защитных реакций в росте и развитии (LTP-белки), сигнальных системах и процессах микоризообразования (хитиназы) (Amador et al., 2021; Pusztahelyi, 2018; Stotz et al., 2009).

На основе скрининга и количественного анализа транскриптов генов, содержащих структурно-функциональные домены: циклинзависимой киназы CDK (CDD ID: CDK-B — cd07835, CDK-C — cd07840), регуляторной субъединицы циклинзависимой киназы CKS (pfam01111, smart01084) и циклина (smart00385, pfam08613) для проростков, выращенных в условиях биотического стресса, отмечается снижение их экспрессионной активности, вплоть до отсутствия регистрации транскриптов (рис. 1). Согласно кластерному анализу на основе значений  $\log_2(\text{RPM})$ , транскрипты PR-генов (PR-12, PR-14\_nsLTP1, PR-14\_nsLTP2, PR-14\_nsLTP-like) и участвующих в регуляции клеточного цикла (CDK-B, CDK-C, CKS и циклина) образуют общий кластер статистически достоверно различающийся между анализируемыми транскриптомами. Для транскриптомов контрольной и устойчивой групп проростков отмечены близкие значения экспрессии транскриптов кластера; так, медиа-

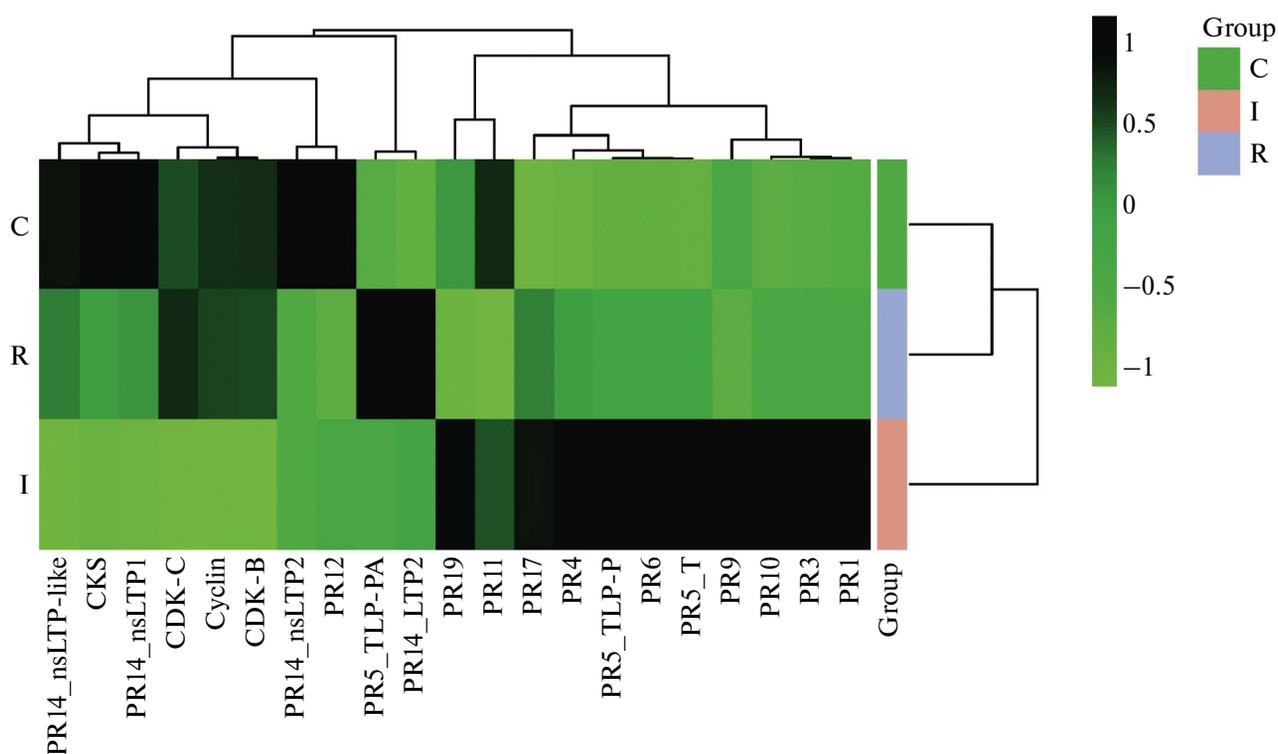
на составила 7.80 (интерквартильный размах Q1 и Q3 — 7.05 и 10.24) и 7.00 (интерквартильный размах Q1 и Q3 — 5.04 и 7.70) соответственно.

Таким образом, для транскриптомных профилей проростков *P. sylvestris*, инфицированных культурой микромицета *Fusarium sp.* выполнен скрининг и установлены структуры транскриптов PR-генов и генов, участвующих в регуляции клеточного цикла (CDK, CKS и циклина), а также проведена предварительная оценка их экспрессионной активности. Для восприимчивой группы растений отмечено повышенное присутствие транскриптов PR-генов при пониженной транскрипции генов, участвующих в регуляции клеточного цикла.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На ранних этапах онтогенеза, когда энергетические ресурсы растительного организма на-

правлены на рост и развитие, в условиях биотического стресса, сопровождающегося активацией индуцированной системы защиты, может происходить угнетение клеточного цикла (Develey-Riviere et al., 2007; Qi et al., 2020). В нашей работе для исследуемых транскриптомов проростков *P. sylvestris* проведен скрининг и установлены структуры транскриптов PR-генов и генов, участвующих в регуляции клеточного цикла (CDK, CKS и циклина), получены предварительные данные о патоген-индуцированном участии транскриптов комплекса семейств PR-генов в защитном ответе в условиях инфицирования культурой микромицета *Fusarium sp.*, а также угнетении транскрипции регуляторов клеточного цикла CDK, CKS и циклина. Для детального исследования механизмов устойчивости необходимо проводить комплексную оценку дифференциальных экспрессионных профилей в условиях патогенеза, с установлением участия функционально различающихся групп генов: PR-белков,



**Рис. 1.** Тепловая карта экспрессии PR-генов и регуляторов клеточного цикла — CDK, CKS и циклина. R — устойчивая группа, I — неустойчивая группа, C — контрольная группа проростков *P. sylvestris*.

компонентов сигнальных систем, а также специфических белков устойчивости (R-белков), способных распознавать эффекторы патогена и формировать защитные реакции.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулагин А.Ю. Особенности произрастания древесных растений в экстремальных лесорастительных условиях: соотношение эври-, пост- и преадаптаций // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3–4. С. 1338–1340.
2. Amador V.C., Santos-Silva C.A.D., Vilela L.M.B., Oliveira-Lima M., de Santana Rego M., Roldan-Filho R.S., Benko-Iseppon A.M. Lipid transfer proteins (LTPs)—Structure, diversity and roles beyond antimicrobial activity // Antibiotics. 2021. V. 10. № 11. P. 1281.
3. Carneiro A.K., Montessoro P.D.F., Fusaro A.F., Araujo B.G., Hemerly A.S. Plant CDKs — driving the cell cycle through climate change // Plants. 2021. V. 10. № 9. P. 1804.
4. Develey-Riviere M.P., Galiana E. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom // New Phytologist. 2007. V. 175. № 3. P. 405–416.
5. Islam M.M., El-Sappah A.H., Ali H.M., Zandi P., Huang Q., Soaud S.A., Liang Y. Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: A review // South African Journal of Botany. 2023. V. 160. P. 414–427.
6. Keeling C.I., Bohlmann J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens // New Phytologist. 2006. V. 170. № 4. P. 657–675.
7. Puztahelyi T. Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions // Mycology. 2018. V. 9. № 3. P. 189–201.
8. Qi F., Zhang F. Cell cycle regulation in the plant response to stress // Frontiers in plant science. 2020. V. 10. P. 1765.
9. Stotz H.U., Thomson J., Wang Y. Plant defensins: defense, development and application // Plant signaling & behavior. 2009. V. 4. № 11. 1010–1012.

## Screening and Transcriptomic Activity of PR Genes and Cell Cycle Regulators in *Pinus Sylvestris* L. Seedlings Infected with *Fusarium* sp.

L. V. Mozharovskaya

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Proletarskaya str. 71, Gomel, 246001 Belarus  
e-mail: milamozh@yandex.ru

Transcriptome analysis of *Pinus sylvestris* seedlings under infection with *Fusarium* sp. has been performed to screen and quantify the transcripts of protective PR genes and the genes involved in cell cycle regulation (CDK, CKS, and cyclin). Under conditions of biotic stress, a decrease in transcriptional activity of the genes of cell cycle regulators was found, with increased expression of PR-genes. The results obtained expand our knowledge about genetic determination of resistance factors and evaluation of adaptive features of *P. sylvestris* juvenile plants to infections.

*Keywords:* transcriptome, PR-genes, cell cycle regulators, *Pinus sylvestris*, *Fusarium*