

Анализ структурно-функциональных особенностей и экспрессионной активности *PR-9* генов проростков *Pinus sylvestris* в условиях инфицирования *Fusarium sp.*

Можаровская Л. В.^{А*}

^А Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь.

*E-mail: milamozh@yandex.ru

Основными компонентами системной приобретенной устойчивости растений являются PR-белки (с англ. pathogenesis-related proteins), которые входят в состав сигнальных систем растений, индуцируются в ответ на абиотический и биотический стресс, в том числе на инокуляцию фитопатогенных микроорганизмов. Среди генов, кодирующих PR-белки, относительно их структурно-функциональной организации в литературе выделяют до 19 семейств (от PR-1 до PR-19). К семейству PR-9 относятся растительные секреторные пероксидазы III класса.

Целью настоящего исследования являлось идентифицировать и изучить структурно-функциональные особенности, а также экспрессионную активность транскриптов генов *PR-9* проростков *Pinus sylvestris* в условиях биотического стресса – инфицирования *Fusarium sp.*

В лабораторных условиях проводился посев и выращивание семян *P. sylvestris* с последующим заражением культурой *Fusarium sp.* Создание повышенного инфекционного фона достигалось поэтапным внесением инокулюма гриба в субстрат перед посадкой семян, на 7 и 14 день после появления всходов. В качестве инокулюма использовали изолят *Fusarium sp.* (NCBI GenBank ID: MW429282.1), идентифицированного и выделенного из сеянцев *P. sylvestris* с признаками инфекционного полегания (лесной питомник Брестского лесхоза). Препараты кДНК получали из тканей корня и гипокотилия индивидуальных растений: проростков с симптомами инфекционного полегания и контрольного варианта, объединенных в пул ($n = 15$ для каждой группы растений). Высокопроизводительное секвенирование (NGS) кДНК выполнялось на основе секвенирующей платформы Ion PGM System. Обработку транскриптомных данных выполняли с помощью программных пакетов Ion Torrent Suite v. 5.0.4., UGENE v. 1.29.0 и др. Идентификация последовательностей проводилась с использованием онлайн-сервиса BLAST в NCBI GenBank. Количественную оценку транскриптомов проводили с применением RPM метрики. Сравнительный анализ, а также изучение особенностей структурно-функциональной организации идентифицированных транскриптов проводились на основе специализированных онлайн сервисов: NCBI CD-Search, NCBI ORFfinder, SWISS-MODEL, Phyre2.

По результатам анализа данных секвенирования и аннотации транскриптомов проростков *P. sylvestris* идентифицирована группа EST-маркеров *pr-9*, детерминирующих секреторную пероксидазу растительного типа (функциональный домен cd00693: secretory_peroxidase). Данный тип пероксидаз относится к III классу надсемейства гем-зависимых пероксидаз растений. Пероксидазы III класса, как правило, локализованы во внеклеточном пространстве или вакуолях растений, где выполняют множество тканеспецифичных функций: участвуют в детоксикации пероксида водорода (например, в хлоропластах и цитозоле), биосинтезе компонентов клеточной стенки (в частности, в процессах полимеризации монолигнолов), анаболизме этилена и катаболизме ауксина, а также в ответных реакциях на стресс [1].

При сравнительном анализе транскриптомов, в условиях заражения *Fusarium sp.* отмечено повышение экспрессионной активности транскриптов *pr-9* генов (RPM = 4778,94 – контрольный вариант; RPM = 6098,56 – условия инфицирования). В то же время, детальный анализ нуклеотидных последовательностей наиболее представленного транскрипта, в контрольной и исследуемой выборках, показал их различное происхождение, т.е. неортологичный характер. Для транскриптома проростков *P. sylvestris* варианта контроля идентифицировано 123 транскрипта, относящихся к генам *PR-9* семейства, из них наиболее представленный транскрипт №4468 (6% от общего числа коротких прочтений) при сравнительном изучении в базе данных NCBI по нуклеотидной последовательности показал наибольшее сходство ($\approx 90\%$) с учетной записью FJ050756.2 (*Pinus taeda*). Среди аминокислотных последовательностей наибольший уровень сходства в 79,6% наблюдался с секреторной пероксидазой III класса *Ginkgo biloba* (NCBI GenBank ID: AFR44628.1), кодируемой геном *Prx09* (NCBI GenBank ID: JX399851.1), а также с аминокислотной последовательностью пероксидазы *Picea abies* (NCBI GenBank ID: CAL25300.1). Для пространственной модели транслируемого функционального домена транскрипта №4468 отмечено наличие трех субдоменов: N-концевого дистального Ca^{2+} -связывающего, C-концевого проксимального Ca^{2+} -связывающего и В-субдомена.

Для транскриптома, в условиях инфицирования *Fusarium sp.*, было идентифицировано 27 транскриптов, содержащих в транслируемой последовательности функциональный домен cd00693, идентифицированных как представителей *PR-9* семейства. Сравнительное изучение в базе данных NCBI наиболее представленного среди *PR-9* транскрипта №769 (долевое участие – 22%, NCBI GenBank ID: MZ222279) показало наибольший уровень идентичности (88%) с депозитом BT122797.1, представляющим собой неаннотированную мРНК *Picea sitchensis*. Среди аннотированных

депозитов, наибольший уровень подобия (85% по транслируемой последовательности) был отмечен с пероксидазой *Picea abies* (NCBI GenBank ID: CAD92858.1). В отличие от вышепредставленного транскрипта №4468 контрольного варианта структура полипептида транскрипта №769 включает в своем составе следующие три субдомена: на N-конце дистальный Na^+ -связывающий, на C-конце проксимальный Ca^{2+} -связывающий и В-субдомен.

Присутствие Na^+ -связывающего субдомена вместо типичного Ca^{2+} согласуется с другими исследованиями пространственных структур растительных пероксидаз III класса [2, 3]. Присутствие сайтов связывания Ca^{2+} или Na^+ у пептидов обоих транскриптов, предположительно, указывает на ионный тип регуляции каталитической активности фермента [2]. Кроме того, согласно предсказанной модели, данный полипептид в качестве субстрата может использовать индол-3-уксусную кислоту (ИУК) – основной гормон растений класса ауксинов, участвующий в регуляции различных процессов роста и развития. Согласно гипотезе, выдвинутой S. F. Fu et al., данный растительный гормон может использоваться в качестве своеобразного «физиологического кода» взаимодействий фитопатогенных микроорганизмов и растений [4]. Таким образом, в ходе анализа транскриптомов проростков *P. sylvestris* в условиях инфекции *Fusarium* sp., в тканях растений диагностировано повышенное содержание мРНК пероксидаз с сайтами связывания ИУК. Исходя из того, что ИУК может выступать в качестве элиситора, стимулирующего индуцированную устойчивость растений, полученные данные указывают на участие ИУК-пероксидазного сигнального пути в рассматриваемой патосистеме.

Библиографические ссылки

1. Campa, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function / A. Campa // Peroxidases in chemistry and biology. – 1991. – Vol. 2. – P. 25–50.
2. Structural and spectroscopic characterisation of a heme peroxidase from sorghum / C. I. Nnamchi [et al.] // JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2016. – Vol. 21. – P. 63–70.
3. Crystal structure analysis of cationic peroxidase from proso millet and identification of its phosphatase active sites / X. Cui [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2021. – Vol. 69. – №. 22. – P. 6251–6259.
4. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms / S. F. Fu [et al.] // Plant signaling & behavior. – 2015. – Vol. 10, № 8. – P. e1048052.