

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_      \_\_\_\_\_  
подпись      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_ »      \_\_\_\_\_ 20 \_\_ г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

06.04.01.06 Геномика и биоинформатика

Изучение генетических механизмов нарушения доминирования  
апикального роста деревьев

Научный руководитель	_____	<u>проф., к.б.н</u>	<u>К.В.Крутовский</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Э.Е.Бауэр</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>проф., д.б.н</u>	<u>Ю.Л.Орлов</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Изучение генетических механизмов нарушения доминирования апикального роста деревьев» содержит 43 страницы, 7 рисунков, 4 таблицы, 57 использованных источников.

*Ключевые слова:* апикальное доминирование, «ведьмины метлы», дифференциальная экспрессия, РНК секвенирование, сосна обыкновенная, сосна кедровая сибирская, транскриптом.

*Цель:* провести сравнительный анализ дифференциальной экспрессии генов у «ведьминых метел» и нормальной кроны.

*Задачи:* осуществить поиск дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), потенциально связанных с аномальным морфогенезом кроны («ведьминой метлы») у сосны кедровой сибирской и сосны обыкновенной; провести функциональную аннотацию выявленных ДЭГ; сравнить полученные результаты с опубликованными научными данными по генетическим механизмам нарушения апикального роста деревьев.

*Актуальность* данной темы обусловлена тем, что исследование мутации ВМ поможет выявить генетические механизмы апикального доминирования в морфогенезе деревьев.

Найдено и проаннотировано 61 ДЭГ для образцов сосны обыкновенной и 164 ДЭГа для образцов сосны кедровой сибирской. Обсуждена возможная функциональная роль обнаруженных ДЭГов в контексте изучаемого фенотипа ВМ. Все представленные белки поддерживают анатомическую структуру клетки. Большая часть белков, участвует в активации пререпликативного комплекса и поддержании минихромосом, а также в процессах де- и убиквитинирования. Сравнительный анализ полученных результатов с опубликованными научными данными по генетическим механизмам нарушения апикального роста деревьев показал отсутствие аналогичных работ по изучению дифференциальной экспрессии генов у ВМ и НК, что свидетельствует об уникальности проведённого исследования.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	2
Введение.....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Объекты исследования .....	6
1.2 Ведьмины метлы (ВМ) .....	7
1.3 Дифференциально экспрессируемые гены.....	11
2 Материалы и методы .....	15
2.1 Анализируемые образцы .....	15
2.2 Оценка качества транскриптомной сборки .....	17
2.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов сосны обыкновенной и сосны сибирской.....	17
2.4 Взаимодействия белков, кодируемых найденными ДЭГами .....	18
3 Результаты.....	18
3.1 Анализируемые образцы .....	18
3.2 Оценка качества транскриптомной сборки .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов сосны обыкновенной и сосны сибирской.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Аннотация дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ).....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Взаимодействия белков, кодируемых найденными ДЭГами .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4 Обсуждение.....	18
4.1 ДЭГи, вовлеченные в репликацию ДНК.....	19
4.2 ДЭГи, участвующие в созревании тРНК.....	20
4.3 ДЭГи, вовлеченные в процессы де- и убиквитинирования.....	20
4.4 ДЭГи, отвечающие за слияние пузырьков-везикул.....	21
5 Выводы .....	22
Заключение .....	23
Список сокращений .....	24
Список использованных источников .....	25

## ВВЕДЕНИЕ

Хвойные леса составляют основу бореальных экосистем и имеют колоссальное хозяйственное значение. Они оказывают огромное локальное и глобальное влияние на экосистемы, играя важную роль в регуляции водного стока и сохранении почв, являясь важнейшей частью углеродного цикла и инструментом очистки атмосферного воздуха от загрязнений.

Одними из основных лесообразующих бореальных хвойных являются сосны (род *Pinus*), включающие сосну обыкновенную (*Pinus sylvestris* L.) и сосну кедровую сибирскую (*P. sibirica* Du Tour), которые являются очень ценными и широко используемыми древесными породами.

У данных видов, также как и у многих других древесных, довольно часто встречается мутантный фенотип «ведьмина метла» (ВМ), который связан с нарушением апикального роста у деревьев и бурным латеральным ветвлением. Важно отметить, что апикальное доминирование является важнейшей характеристикой дерева, отличающей деревья от кустарников и других растений. Апикальное доминирование наблюдается в течение всей жизни дерева и определяет развитие побегов, ветвление и форму кроны. Фактически деревья продолжают расти всю свою жизнь, хотя апикальный рост замедляется по мере старения. Генетические механизмы разнообразия деревьев по уровню апикального доминирования до сих пор в значительной степени неизвестны. Исследование мутации «ведьмина метла» (ВМ) на полногеномном транскриптомном уровне может помочь выявить генетические механизмы апикального доминирования в морфогенезе древесных растений.

ВМ определяются как часть кроны дерева с аномально густым ветвлением и медленным ростом побегов, визуально отличающиеся от нормальной кроны (НК). ВМ могут возникнуть из-за бактериальной или грибковой инфекции, а также, предположительно, из-за соматической мутации в апикальной меристеме почки. Для нашего исследования были выбраны ВМ, которые наиболее вероятно связаны с соматическими мутациями и для которых было показано наследование

этого признака в потомстве, полученном из семян шишек, образующихся на ветках ВМ. Кроме этого, такие ВМ имеют характерные признаки, такие как здоровый вид, нормальное размножение и большая продолжительность жизни, хорошо отличающие их от ВМ, возникших из-за бактериальной или грибковой инфекции.

Мутационные ВМ является основным источником растительного генетического материала для декоративных и карликовых сортов в селекции деревьев, особенно хвойных. Однако это только первый шаг в процессе разведения. Только работа с семенным потомством ВМ от свободного и контролируемого скрещивания позволяет получить устойчивые декоративные сорта с новыми признаками. Поэтому изучение полового размножения и семенной продуктивности ВМ чрезвычайно важно.

Целью настоящей работы является проведение сравнительного анализа дифференциальной экспрессии генов у «ведьминых метел» и нормальной кроны.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. осуществить поиск дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), потенциально связанных с аномальным морфогенезом кроны («ведьминой метлы») у сосны кедровой сибирской и сосны обыкновенной;
2. провести функциональную аннотацию выявленных ДЭГ;
3. сравнить полученные результаты с опубликованными научными данными по генетическим механизмам нарушения апикального роста деревьев.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Объекты исследования

Хвойные леса играют ключевую роль в функционировании бореальных экосистем и обладают огромным экономическим значением. Они оказывают значительное влияние на локальные и глобальные экосистемы, регулируя водный сток, защищая почвы, участвуя в углеродном цикле и очищая атмосферу от загрязнений. Помимо ценной древесины и целлюлозы, хвойные растения богаты биологически активными соединениями (БАВ), такими как терпеноиды, флавоноиды, алкалоиды, стероиды и полисахариды, представляющие интерес для фармацевтической промышленности [1].

Род *Pinus*, включающий сосну обыкновенную (*Pinus sylvestris* L.) и сосну кедровую сибирскую (*P. sibirica* Du Tour), является одним из основных лесообразующих родов в бореальных лесах. Эти виды ценятся за свою древесину и широко используются в различных отраслях. Россия обладает крупнейшими в мире запасами хозяйственно ценных хвойных пород, составляющими около 80% мировых ресурсов [1]. Несмотря на возобновляемость лесных ресурсов, объемы лесозаготовок превышают темпы восстановления лесов. Существует проблема контроля за законностью рубок, что угрожает устойчивому лесопользованию.

Сосна обыкновенная – это высокорослое дерево, достигающее 25-40 метров в высоту с прямым стволом диаметром до 0,5-1,2 метров. Она распространена в Евразии, от Испании и Великобритании на западе до бассейна реки Алдан и среднего течения Амура на востоке. Ареал ее обитания простирается от Лапландии на севере до Монголии и Китая на юге [2].

Сосна обыкновенная является первой по распространенности хвойной породой в мире и имеет большое хозяйственное и экологическое значение [3]. Сосна обыкновенная отличается высоким генетическим разнообразием, определяющим количественные, качественные и адаптивные признаки [3]. Сосна обыкновенная – очень важная в хозяйственном отношении древесная порода Северного полушария. Её древесина используется как строительная, для

изготовления мебели с дальнейшей переработкой в виде шпона, ДВП или ДСП; а в некоторой степени и для целлюлозно-бумажного производства [4].

Сосна кедровая сибирская (кедр сибирский) (*Pinus sibirica*) – это вечнозеленое дерево высотой 35–40 м и диаметром ствола до 1,8 м в полной зрелости. Преимущественно произрастает в Сибири, на Урале и в северных частях Европы. Как и у других представителей подрода *Strobus*, её иголки сгруппированы внутри листопадного влагалища и имеют длину примерно 5–10 см. Шишки кедра сибирского имеют длину примерно 5–9 см, а семена могут достигать 9–12 мм в длину. Традиционно известные как кедровые орехи, семена *P. sibirica* считаются ценным лекарственным растительным сырьем, им приписывают широкий спектр традиционных свойств. Например, отвар назначают при ревматизме и артрите, а настой — при неврозах, заболеваниях печени и почек. Фармакологическое действие семян *P. sibirica* связано с наличием как липофильных, так и гидрофильных биоактивных веществ, а именно терпенов, жирных кислот и триацилглицеридов, витаминов, полифенолов, аминокислот и макро/микроэлементов [5].

Сосна сибирская имеет большое экологическое, средообразующее и ресурсорегулирующее значение, выполняет важнейшие водоохранные, почвозащитные и климаторегулирующие функции. Кроме того, сосновые леса имеют большое рекреационное и оздоровительное значение. Древесина, хвоя и орехи *P. sibirica* широко используются в фармацевтической, химической, парфюмерной и пищевой промышленности [6].

## **1.2 Ведьмины метлы (ВМ)**

ВМ определяются как деформированная часть кроны дерева с аномально густым латеральным (боковым) ветвлением и подавленным апикальным (верхушечным) ростом побегов, визуально отличающиеся от НК. Эти деформации обычно вызывают нематоды, насекомые, клещи, оомицеты, грибы, вирусы и фитоплазма. Распространённым фактором является грибковая или

микробная инфекция [7]. Например, ВМ может возникнуть в результате инфицирования некоторых тропических деревьев из семейств Malvaceae и Malpighiaceae грибковым патогеном *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*) [8, 9]. ВМ у берёз вызывается грибковым патогеном *Taphrina betulina* и другими близкородственными видами *Taphrina* [10, 11]. Деревья с такими «патологическими» ВМ обычно имеют нездоровый вид, подавленную репродукцию и короткую продолжительность жизни с очаговым распространением [12].

Кроме того, одним из вероятных механизмов возникновения ВМ является доминантная соматическая мутация, предположительно возникающая в апикальной меристеме почки. Такие ВМ визуально заметно отличаются от ВМ, вызванных патогенами [13]. Доказательством доминантной мутации в том материале, который мы изучали, служит сегрегация в семенном потомстве ВМ, полученном от свободного скрещивания нормальной пыльцой. Она близка к соотношению 1:1, разделяя потомство на два дискретных класса: карликовые и нормальные сеянцы [14]. Мутационные ВМ отличаются от "патологических" ВМ своим здоровым внешним видом, нормальным размножением и продолжительностью жизни. Как правило, они возникают спорадически, с примерной встречаемостью одна ВМ на 5–10 тысяч деревьев. Основные отличия ВМ от НК заключаются в усилении ветвления, уменьшении длины побегов и уменьшении апикального доминирования [15]. Для нашего исследования были выбраны именно такие ВМ, которые наиболее вероятно связаны с соматическими мутациями и для которых было показано наследование этого признака в потомстве, полученном из семян шишек, образующихся на ветках ВМ.

Мутационные ВМ является основным источником растительного генетического материала для декоративных и карликовых сортов в селекции деревьев, особенно хвойных. Однако это только первый шаг в процессе разведения. Только работа с семенным потомством ВМ от свободного и контролируемого скрещивания позволяет получить декоративные сорта с



новыми признаками. Поэтому изучение генетического контроля ВМ, полового размножения и семенной продуктивности ВМ чрезвычайно важно [16].

Природа мутации, вызывающей ВМ, остается не до конца изученной. Существует гипотеза, что мутационные ВМ являются атавизмом, то есть возвратом к более примитивному состоянию [17], о чём могут свидетельствовать некоторые особенности. Во-первых, мутационные ВМ были обнаружены на разных видах хвойных из различных семейств. Во-вторых, мутационные ВМ у разных видов хвойных имеют ряд сходных черт – увеличение интенсивности ветвления, нарушение апикального доминирования и др. В-третьих, у сортов, полученных на основе семенного и вегетативного потомства мутационных ВМ иногда случается реверсия (возврат к нормальному морфогенезу) и формируются нормальные не мутантные побеги (часто можно встретить у *Picea glauca* var. *albertiana* сорт *Conica*). Эти факты свидетельствуют о существовании особой морфогенетической или эпигенетической программы в генотипе хвойных, которая может активироваться мутацией, усложняя архитектуру ветвления.

Влияние мутационных ВМ на радиальный рост ветвей в некоторой степени сходно с действием омелы (*Viscum album* L.) [18]. Заражение сосны омелой приводит к деградации кроны у ее хозяина за счет уменьшения радиального прироста и влияет на характеристики хвои. Удаление омелы приводит к увеличению скорости роста хозяев, что аналогично эффекту увеличения роста после гибели части ВМ [19].

ВМ резко отличаются от остальной части кроны морфологически и физиологически. ВМ нарушают нормальные донорно-акцепторные отношения в дереве и активно потребляют ресурсы, не участвуя в их производстве, за счет активного ветвления с уменьшенным апикальным доминированием. Мутация инициирует сложный набор физиологических изменений, скорее всего, вызванных изменением гормонального баланса. Это, в свою очередь, приводит к изменениям в морфологическом развитии, в том числе к нетипичному обилию почек, что еще больше усиливает аттрактивную способность ВМ. Апикальная

меристема ведущего побега может выступать в качестве сильного метаболического поглотителя из-за его высокой скорости роста и уровня гормонов, лишая питательных веществ латентные пазушные почки.

В отличие от патологических ВМ, репродукция мутационных ВМ не подавлена. Шишки и семена в ВМ часто мельче, чем в нормальной части кроны, но иногда они не отличаются от НК, и в обоих случаях семена всхожие [15]. Хотя доля распутившихся семян в ВМ снижена по сравнению с нормальными шишками, динамика потерь семязачатков и семян в процессе их развития совершенно неизвестна [14].

Кедр сибирский, как и многие другие хвойные, может нести ВМ с различными сочетаниями признаков. Изменчивость вегетативных признаков ВМ может отразиться на изменчивости репродуктивных признаков, но не было исследований с достаточным количеством клонов, чтобы определить, всегда ли структура женских шишек и эффективность семян, затронутые мутацией, изменяются равномерно.

Специфика кедра сибирского как «орехоплодной» породы требует разработки новых подходов к селекции, отличных от традиционных методов лесной селекции. Одним из приоритетных направлений является создание низкорослых сортов, что упростит и обеспечит более безопасный сбор орехов. ВМ являются перспективным материалом для выведения таких сортов.

ВМ представляют значительный интерес для селекции хвойных. Многие карликовые и обильно ветвящиеся сорта хвойных были выведены из вегетативного и семенного потомства мутационных ВМ. Несмотря на широкое использование ВМ в селекции, механизмы их мутации изучены недостаточно. Предполагается, что мутация ВМ имеет сложную генетическую природу, и может проявляться в разных степенях интенсивности. Влияние мутации на ветвление и другие морфологические признаки может быть слабым, средним или сильным. Изучено влияние мутации ВМ на кариотип и цитологию *Pinus sylvestris*, но влияние на мужскую генеративную сферу остается малоизученным. Это связано с редкостью ВМ с мужской сексуализацией побегов. В литературе

известны лишь три работы, посвященные данному феномену [20].

### 1.3 Дифференциально экспрессируемые гены

Экспрессия генов — это процесс, посредством которого закодированная в гене информация реализуется функционально. В основном это происходит посредством транскрипции молекул РНК, кодирующих белки, или некодирующих молекул РНК, выполняющих другие функции.

Ген является дифференциально экспрессированным, если наблюдаемая разница или изменение числа транскриптов (определяемое через число секвенированных нуклеотидных прочтений РНК), т.е. уровней экспрессии между двумя экспериментальными образцами, в данном случае образцы РНК, выделенные из тканей ВМ и НК, является статистически значимой. Чтобы идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены между ВМ и НК, важно оценить статистические различия в числе прочтений и в дальнейшем изучить функциональную роль (проаннотировать) дифференциально экспрессируемые гены.

Высокопроизводительное секвенирование РНК (т.е., RNA-Seq) стало основным методом для измерения уровней экспрессии. RNA-Seq может выполняться без предварительного знания генома и транскриптома объекта и имеет широкий спектр применений, таких как: реконструкция транскриптома *de novo* (без эталонного «референсного» генома), оценка нуклеотидной изменчивости, оценка паттернов метилирования, и т.д.

Анализ данных секвенирования РНК обычно включает несколько этапов: тримминг, выравнивание, подсчет и нормализацию секвенированных прочтений и последующий анализ дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) путём сравнения разных образцов, полученных из разных тканей или в различных условиях. Тримминг используется для исключения адаптерных последовательностей и удаления некачественных нуклеотидов. Его следует использовать неагрессивно, вместе с разумно выбранной длиной чтения, чтобы

избежать неразумной потери данных, усложняющей изучение экспрессии генов и *de novo* сборку транскриптома. Выравнивание прочтений на эталонный геном или транскриптом при их наличии обычно является вторым, но необязательным шагом в рабочем процессе RNA-seq. После картирования прочтений производится их подсчет или количественная оценка прочтений для каждого гена или транскрипта. Затем следует процедура нормализации для устранения возможной систематической ошибки секвенирования. Поскольку подсчет с последующей нормализацией является важнейшим компонентом анализа данных секвенирования РНК, было разработано несколько методов и опубликовано множество сравнительных исследований, оценивающих их пригодность. Заключительным этапом секвенирования РНК является анализ дифференциальной экспрессии и дополнительная аннотация для выявления или верификации функциональной роли транскриптов. Основная проблема на данный момент заключается в том, как точно обнаружить ДЭГ между двумя или более образцами РНК. С этой целью было разработано большое количество инструментов, облегчающих анализ и, таким образом, составление списков значимых ДЭГ. Из-за влияния этого последнего шага алгоритмы, используемые для обнаружения ДЭГ, сравнивались во многих публикациях, где авторы анализируют плюсы и минусы применения разных алгоритмов [21].

В этом сценарии основная проблема анализа секвенирования РНК заключается в том, что различные этапы должны быть последовательно объединены в полный рабочий процесс или конвейер («пайплайн»), и пользователям приходится выбирать между множеством возможных методологических подходов и вариантов. Это показывает сложность анализа секвенирования РНК и является одним из наиболее важных моментов для получения точных результатов как на исходном, так и на уровне ДЭГ. Многие возможные комбинации текущих алгоритмов в RNA-seq были подвергнуты сравнительному анализу, чтобы помочь определить наилучший рабочий процесс, но их производительность остается предметом обсуждения [22].

Методы дифференциального анализа экспрессии генов из RNA-Seq можно

разделить на два основных подмножества: параметрические и непараметрические. Параметрические методы собирают всю информацию о данных внутри параметров. В этих случаях можно прогнозировать значение неизвестных данных, наблюдая за принятой моделью и ее параметрами. Когда параметрические методы применяются к дифференциальной экспрессии генов, предполагается, что обычно после нормализации каждое значение экспрессии для данного гена отображается в определенном распределении, таком как распределение Пуассона или отрицательное биномиальное распределение. С другой стороны, непараметрические методы могут фиксировать более подробную информацию о распределении данных, т.е. не навязывая жёсткой модели для подбора. Это возможно, потому что непараметрические модели учитывают, что распределение данных не может быть определено из конечного набора параметров, поэтому количество информации о данных может увеличиваться с их объемом [23].

Методы секвенирования следующего поколения позволяют исследователям получать доступ к гораздо большему объему данных, чем было доступно ранее. В частности, процедуры секвенирования РНК (RNA-seq) предоставляют множество информации об уровнях экспрессии генов различных организмов в различных условиях с высоким разрешением. Естественным следствием этой информации является концепция ДЭГ, которые представляют собой гены, уровни экспрессии которых определены как значительно дифференциально экспрессируемые в разных образцах РНК, полученных в двух или более разных условиях, состояниях или из разных тканей. Были разработаны специальные инструменты для определения того, какие гены экспрессируются по-разному. Инструменты дифференциальной экспрессии генов выполняют статистические тесты, основанные на количественных оценках экспрессированных генов, полученных в результате компьютерного анализа необработанных последовательностей РНК (например, картирование и сборка), чтобы определить, какие гены имеют статистически значимое различие, а также предоставление информации, связанной с уровнем экспрессии и попарной

величиной различия для каждого гена. Анализ ДЭГ может дать значительное представление о генетических механизмах в организмах, которые лежат в основе фенотипических различий, включая модели роста растений, обнаружение происхождения опухоли и изучение микробиомов [24].

Изучение различий по ДЭГ между болезненным и здоровым состоянием помогает понять патологию болезней и, в конечном итоге, лечить их. Одним из конкретных направлений исследований являются анализ ДЭГ, который включает идентификацию генов, которые дифференциально экспрессируются при заболевании. В фармацевтических и клинических исследованиях ДЭГ могут быть полезны для точного определения биомаркеров-кандидатов, терапевтических мишеней и генных сигнатур для диагностики. Хотя определенные изменения экспрессии генов не всегда могут трансформироваться в последующую биологическую активность, такие данные, тем не менее, могут быть объединены с другими биологическими данными для создания интегрированных анализов, таких как построение целевого ландшафта болезни [25].

В научной литературе информация о ДЭГ в основном встречается в неструктурированном виде и разбросана по публикациям.

Обнаружение ДЭГ при лечении/состоянии является важным шагом, а иногда и основной целью статистического анализа данных секвенирования РНК. Идентификация ДЭГ помогает выяснить функцию генов, когда клетки реагируют на различные виды лечения/условия. Кроме того, обнаружение ДЭГ может быть предварительным шагом для кластеризации профилей экспрессии генов или тестирования обогащения набора генов. Из-за короткой истории RNA-seq и ее непрерывного развития пока нет доступных стандартных методов для обнаружения ДЭГ на основе таких данных.

Многие исследования посвящены этому вопросу, опубликовано много статей, и, вероятно, еще больше будет опубликовано [26]. Но статей с изучением ДЭГ в контексте аномалий развития очень мало. В частности, исследование *Pinus yunnanensis* var. *pygmaea* [27] показало, что причинами утраты

верхушечного доминирования побегов и формирования многоветвистости могут быть недостаток цитокининов и массивное накопление абсцизовой кислоты и гормонов, связанных с гиббереллинами. Сравнительный транскриптомный анализ выявил, что причиной карликовости у *P. yunnanensis var. pygmaea* может быть высокая экспрессия гена *GA2ox*.

В работе Cai et al. [28] карликовые (или низкорослые), коротколистные и многоветвистые мутанты лиственницы ольгинской (*Larix olgensis*) были обнаружены и использованы для идентификации важнейших генов и регуляторных сетей, контролирующих многоветвистую структуру *L. olgensis*. Однако молекулярные механизмы влияния мутаций на регуляцию многоветвистости у *L. olgensis* остаются неизвестными.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Анализируемые образцы

Исследования клонов ВМ/НК были проведены на научном стационаре «Кедр» Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН под руководством проф. С. Н. Горошкевича.

В качестве объектов были использованы две пары клонов ВМ и НК от двух деревьев сосны обыкновенной и три пары клонов ВМ/НК от трёх деревьев сосны кедровой сибирской, соответственно, которые отличались по плотности ВМ (выраженности фенотипа ВМ) (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Мутационная ВМ на сосне обыкновенной (слева) и кедре сибирском (справа).

Выделение образцов РНК проводили в два периода: (1) в середине июня в период активного растяжения побегов, (2) в первой декаде августа в период детерминации морфогенеза. Это было сделано для того, чтобы охватить как можно больше процессов, которые могут быть задействованы в формировании мутантного фенотипа, а также для верификации. В качестве материала для выделения РНК использовали почки из ВМ и НК (рисунок 2).

В процессе пробоподготовки были созданы кДНК библиотеки и далее проведено их секвенирование. Затем проводилась проверка транскриптомных ридов на наличие митохондриальных, хлоропластных и рибосомальных примесей. Для очистки ридов была использована база рибосомальной РНК Silva [29], содержащая информацию о нуклеотидных последовательностях малой и большой субъединиц рРНК для архей, бактерий и эукариот. Проверка прочтений на наличие органелльного генетического материала проводилась с использованием RefSeq Organelle Genome Resources NCBI – базы данных, содержащей транскриптомы митохондрий и пластид.

Парные прочтения, отдельно для каждого образца, были картированы на полученные базы с использованием ПО Bowtie2.





**Рисунок 2** – Почки на годичном побеге ВМ сосны обыкновенной (слева) и сосны кедровой сибирской (справа).

## **2.2 Оценка качества транскриптомной сборки**

Транскриптомы сосны обыкновенной и сосны кедровой сибирской были собраны *de novo* сотрудниками лаборатории лесной геномики СФУ под руководством проф. К. В. Крутовского с помощью Trinity [30] v2.9.2. Для проверки качества полученных транскриптомов использовалась программа BUSCO v3 [31].

## **2.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов сосны обыкновенной и сосны сибирской**

Чтобы уменьшить общий размер выборки транскриптов в полученной транскриптомной сборке без удаления какой-либо информации о последовательностях, удаляя только «избыточные» (или очень похожие) последовательности была использована программа CD-HIT [32]. Запуск CD-HIT-EST проводился со следующими параметрами: **-c 0,95 -n 8**, где *c* - порог идентичности последовательности, т.е. «глобальная идентичность последовательности» CD-HIT по умолчанию, рассчитываемая как количество одинаковых оснований в выравнивании, разделенное на полную длину более короткой последовательности; *n* - длина слова (8 или 9 нуклеотидах для порогов

c - 0,90 или 0,95).

С помощью скрипта `cdna_fasta_file_to_transcript_gtf.pl`, входящего в состав программы Trinity [30] v2.14.0, была проведена аннотация транскриптома, нужная для подсчета количества прочтений.

Затем с помощью инструмента salmon [33] была проведена количественная оценка экспрессии транскриптов. Запуск salmon проводился со следующими параметрами: `--validateMappings --seqBias`, где `--validateMappings` - выборочное выравнивание; `--seqBias` – позволяет salmon изучить и исправить отклонения во входных данных, связанные с последовательностями.

С помощью метода главных компонент (principal component analysis, PCA) определили, какие переменные влияют на изменчивость данных и должны быть учтены в статистической модели.

Анализ дифференциальной экспрессии генов сосны обыкновенной и сосны сибирской проводили с помощью R-пакета DESeq2 [34].

## **2.4 Взаимодействия белков, кодируемых найденными ДЭГаами**

Построение генной сети полученных ДЭГов (сосны обыкновенной и сосны кедровой вместе) проводилось в онлайн-сервисе STRINGdb [35, 36] с использованием данных для тополя *Populus trichocarpa* как наиболее изученного модельного вида в генетике древесных. В качестве источников взаимодействий были выбраны «Эксперименты» и «Базы данных», минимальный требуемый score взаимодействия – 0.900, максимальное отображаемое число взаимодействий в первом узле – не более 20 взаимодействий.

# **3 РЕЗУЛЬТАТЫ**

## **3.1 Анализируемые образцы**

В связи с авторским правом изъято 11 страниц

## 4 ОБСУЖДЕНИЕ

У многих видов хвойных встречается такой аномальный фенотип, как VM, который выглядит как часть кроны дерева с аномально густым латеральным ветвлением и подавленным апикальным ростом побегов, визуально отличающийся от НК. В этом исследовании мы изучали VM, которые очевидно имеют мутационную генетическую или эпигенетическую природу.

Была проведена оценка дифференциальной экспрессии генов у VM и НК с целью изучения генетических механизмов нарушения апикального роста деревьев.

В ходе исследования было найдено и проаннотировано 61 ДЭГ, общих для образцов сосны обыкновенной, и 164 ДЭГа, общих для образцов сосны кедровой сибирской.

### 4.1 ДЭГи, вовлеченные в репликацию ДНК

Было обнаружено в нашем исследовании, что большая часть белков, кодируемых полученными ДЭГа, участвует в репликации ДНК. Размножение клеток во всех живых организмах требует жесткой регуляции репликации ДНК. Существует несколько механизмов, гарантирующих, что ДНК реплицируется точно и только один раз за клеточный цикл, чтобы в результате митозов возникли две новые дочерние клетки, которые содержат точно такую же информацию, что и предыдущая. Ключевым механизмом контроля, который происходит до того, как клетки вступают в S-фазу, является образование пререпликационного комплекса (pre-RC), который собирается в точках начала репликации путем последовательной ассоциации комплекса распознавания источника, за которым следуют Cdt1, Cdc6 и, наконец, MCM, осуществляющие лицензирование ДНК для начала репликации [37].

Белки поддержания минихромосом (MCM) представляют собой субъединицы pre-RC, которые, вероятно, функционируют как ДНК-хеликазы в S-фазе клеточного цикла [38, 39]. Ранее было описано, что белки MCM у A.

*thaliana* и видов сельскохозяйственных культур (например, кукурузы, гороха и риса) высоко экспрессируются в делящихся тканях, таких как верхушки побегов и кончики корней. Например, когда MCM2 нарушен, растения становятся нежизнеспособными из-за проблем на ранних эмбриональных стадиях, в то время как его сверхэкспрессия увеличивает деление клеток в корневых меристемах [40].

В представленной работе сверхэкспрессия MCM2 (транскрипт DN2002\_c0\_g1\_i83) была обнаружена в кронах, несущих ВМ. Как и корневые апикальные меристемы, апикальные меристемы кроны также содержат стволовые клетки, поэтому можно предположить, что сверхэкспрессия MCM2 может иметь важную функцию в морфологическом проявлении признака ВМ.

#### **4.2 ДЭГи, участвующие в созревании тРНК**

В данной работе наблюдалась сверхэкспрессия транскрипта DN366\_c0\_g2\_i19 в ВМ, который кодирует фермент хлоропластов PRORP1. Эта функция эндонуклеазы важна для получения пригодных для использования тРНК хлоропластов и, следовательно, имеет решающее значение для трансляции. РНКаза Р является важным ферментом, расщепляющим 5'-лидерную последовательность предшественников тРНК. В то время как ферменты-рибонуклеопротеины РНКазы Р, содержащие рибозим, обнаруживаются во всех живых организмах, другой тип РНКазы Р, называемый «PRORP» (от «PROtein-only RNAase P»), который состоит только из белка, встречается в органеллах и ядре только у эукариот [41].

#### **4.3 ДЭГи, вовлеченные в процессы де- и убиквитинирования**

Посттрансляционные модификации играют определенную роль в регуляции роста и развития всех видов эукариот. Среди них убиквитинирование регулирует численность, активность, субклеточную компартиментализацию и транспортировку регуляторных белков, участвующих в различных процессах:

развитии тканей и органелл, самонесовместимости, а также реакции на биотический и абиотический стресс [42, 43, 44, 45, 46].

Судьба модифицированного белка зависит от топологического присоединения полиубиквитиновой цепи. Моноубиквитинированные белки-мишени предназначены для сортировки везикул. Транскрипты DN1734\_c0\_g1\_i16 и DN5444\_c0\_g1\_i17 с повышенной экспрессией в ВМ кодируют субъединицу 26S протеасомы и Lys63-специфическую деубиквитиназу. Lys63-связанные полиубиквитиновые цепи или множественный моноубиквитин определяют сортировку рецепторов к лизосоме посредством взаимодействия с эндосомальным сортирующим комплексом, необходимым для транспорта (ESCRT), тогда как Lys48-связанные полиубиквитиновые цепи и, вероятно, большинство других убиквитиновых связей могут нацеливаться на белок для деградации с помощью 26S протеасомы. Отсюда следует, что деубиквитинирование спасет белки от деградации и повысит их стабильность [47, 48, 49].

#### **4.4 ДЭГи, отвечающие за слияние пузырьков-везикул**

В мультиорганеллярных эукариотических клетках связь между органеллами или компартментами необходима для различных клеточных процессов, таких как деление, рост, дифференцировка и ответы на стимулы окружающей среды. Этого можно достичь путем транспорта белков и мембран через небольшие мембранные контейнеры, называемые везикулами. Чтобы высвободить такой груз в места назначения, везикулы должны быть интегрированы в органеллы-мишени. После прикрепления везикулы сливаются с мембранами-мишенями с помощью растворимых рецепторов белков, чувствительных к N-этилмалеимиду (SNARE) (транскрипт DN218\_c0\_g1\_i4 с повышенной экспрессией в ВМ). Обычно каждый контакт донорной и акцепторной мембраны соединен специфическим привязывающим комплексом [50]. Например, комплексы связывания ядерной вакуоли/эндосомы класса С

(CORVET) и гомотипические комплексы слияния и сортировки белков вакуолей (HOPS, в состав которого входит белок 41, связанный с вакуолярной сортировкой белков VPS41, кодируемого транскриптом DN14534\_c0\_g1\_i3 с пониженной экспрессией в ВМ, опосредуют связывание с лизосомой/вакуолью, а консервативный олигомерный комплекс Гольджи (COG) – многосубъединичный комплекс связывания везикул – участвует в ретроградном транспорте внутри Гольджи. Заключительный этап эндомембранного транспорта включает рециркуляцию компонентов транспортного механизма обратно в донорскую мембрану, опосредованную ретромерным комплексом [51]. Более того, белки плазматической мембраны также могут убиквитинироваться во время эндоцитоза и сортироваться во внутрипросветные везикулы внутри мультивезикулярных телец, регулируемых ESCRT, в состав которого входит белок 37, связанный с вакуолярной сортировкой белков VPS37 (транскрипт DN39316\_c0\_g3\_i8 с пониженной экспрессией в ВМ) [52].

Однако событие слияния двух разных мембран везикулы и целевого компартмента не является энергетически выгодным и требует синергической помощи. У эукариот эту проблему решают SNARE, которые могут спонтанно или энергетически собираться с образованием соответствующего комплекса [53]. Энергия, полученная в результате образования комплекса SNARE, затем используется для слияния двух липидных бислоевых мембран для слияния везикул [54].

## 5 ВЫВОДЫ

Настоящая работа посвящена изучению генетических механизмов нарушения апикального роста деревьев через оценку дифференциальной экспрессии генов у ВМ и НК. Исходя из поставленных задач, были получены следующие результаты:

1. Найдено и проаннотировано 61 ДЭГ для образцов сосны обыкновенной и 164 ДЭГа для образцов сосны кедровой сибирской.

2. Обсуждена возможная функциональная роль обнаруженных ДЭГов в контексте изучаемого фенотипа ВМ. Все представленные белки поддерживают анатомическую структуру клетки. Большая часть белков, участвует в активации пререпликативного комплекса и поддержании минихромосом, а также в процессах де- и убиквитинирования.
3. Сравнительный анализ полученных результатов с опубликованными научными данными по генетическим механизмам нарушения апикального роста деревьев показал отсутствие аналогичных работ по изучению дифференциальной экспрессии генов у ВМ и НК, что свидетельствует об уникальности проведенного исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проделанная работа является частью проекта **«Ведьмины метлы» мутационного происхождения у российских видов *Pinus*: характер разнообразия и молекулярно-генетическая природа»** Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (руководитель с.н.с., к.б.н. Е. А. Жук, соруководитель проф. К. В. Крутовский), финансируемого Российским Фондом Фундаментальных Исследований (РФФИ) в рамках Программы инициативных проектов (грант № 16-04-00440).

Автор выражает искреннюю благодарность К. В. Крутовскому за идею исследования и общее руководство на всех этапах работы, Н. В. Орешковой за пробоподготовку и секвенирование, Е.И. Бондар и В. В. Шарову за помощь в биоинформатическом анализе. Также автор выражает благодарность Новиковой С.В. и всем членам лаборатории лесной геномики за участие в обсуждении работы, помощь и ценные советы.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории лесной геномики и кафедре геномики и биоинформатики (зав. каф. д.б.н И. Е. Ямских).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

COG – conserved oligomeric Golgi (консервативный олигомерный комплекс Гольджи)

CORVET – class C core vacuole/endosome tethering (комплекс связывания ядерной вакуоли/эндосомы класса C)

ESCRT – endosomal sorting complexes required for transport (эндосомальный сортирующий комплекс, необходимый для транспорта)

HOPS – homotypic fusion and vacuole protein sorting (гомотипический комплекс слияния и сортировки белков вакуолей)

MCM-белки – белки поддержания мини-хромосом

PCA – principal component analysis

PPI – белок-белковые взаимодействия

pre-RC – пререпликационный комплекс

SNARE – soluble NSF attachment receptor (растворимые рецепторы белков, чувствительных к N-этилмалеимиду)

VPS37 – Vacuolar protein sorting-associated protein 37 (белок 37, связанный с вакуолярной сортировкой белков)

VPS41 – Vacuolar protein sorting-associated protein 41 (белок 41, связанный с вакуолярной сортировкой белков)

БАВ – биологически активные вещества

ВМ – ведьмины метлы

ДВП – древесноволокнистая плита

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСП – древесно-стружечная плита

ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены

НК – нормальная крона

РНК – рибонуклеиновая кислота



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Chertov, N., Nechaeva, Y., Zhulanov, A., Pystogova, N., Danilova, M., Boronnikova, S., Kalendar, R. Genetic Structure of *Pinus* Populations in the Urals. *Forests* **2022**, 13(8), 1278. <https://doi.org/10.3390/f13081278>
- 2 Eckenwalder, J. *Conifers of the World: The Complete Reference*. Timber Press: Portland, Oregon, USA, **2009**; 744 p.
- 3 Sboeva, Y.; Chertov, N.; Nechaeva, Y.; Valeeva, A.; Boronnikova, S.; Kalendar, R. Genetic Diversity, Structure, and Differentiation of *Pinus sylvestris* L. Populations in the East European Plain and the Middle Urals. *Forests* **2022**, 13(11), 1798. <https://doi.org/10.3390/f13111798>
- 4 Harju, A.; Heiska, S.; Julkunen-Tiitto, R.; Venäläinen, M.; Aronen, T. Somatic Embryogenesis of *Pinus sylvestris* L. from Parent Genotypes with High-and Low Stilbene Content in Their Heartwood. *Forests* **2022**, 13(4), 557. <https://doi.org/10.3390/f13040557>
- 5 Lantto, T.; Damien Dorman H.; Shikov A.; Pozharitskaya O.; Makarov V.; Tikhonov V.; Hiltunen R.; Raasmaja A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chem.* **2009**, 112(4), 936-943. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.008>
- 6 Ferreira-Santos, P., Zanuso, E., Genisheva, Z., Rocha, C., Teixeira, J. Green and Sustainable Valorization of Bioactive Phenolic Compounds from *Pinus* By-Products. *Molecules* **2020**, 25(12), 2931. <https://doi.org/10.3390/molecules25122931>
- 7 Bendix, C., Lewis, J. D. The enemy within: phloem-limited pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2016**, 19(1): 238-254. <https://doi.org/10.1111/mpp.12526>
- 8 Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G. *et al.* A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* 2008, 9: 548. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-548>

- 9 Evans, H.C. (2016). Witches' Broom Disease (*Moniliophthora perniciosa*): History and Biology. In: Bailey, B., Meinhardt, L. (eds) Cacao Diseases. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_5)
- 10 Spanos, Y. A., & Woodward, S. The effects of *Taphrina betulina* infection on growth of *Betula pubescens*. *European Journal of Forest Pathology* 1994, 24(5): 277-286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1994.tb00997.x>
- 11 Christita, M., Sipilä, T. P., Auzane, A., & Overmyer, K. Distinct *Taphrina* strains from the phyllosphere of birch exhibiting a range of witches' broom disease symptoms. *Environmental Microbiology* 2022, 24(8): 3549-3564. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16037>
- 12 Zhuk, E.; Vasilyeva, G.; Goroshkevich, S. Mutational witches' broom impact on the growth of the parent branch in several Pinaceae species. *Dendrobiology* 2020, 83, 52-59. <https://dx.doi.org/10.12657/denbio.083.005>
- 13 Полякова О.И., Жук Е.А., Горошкевич С.Н. Семеношение и структура шишек у клонов мутационных ведьминых метел кедр сибирского // Известия ВУЗов. Лесной журнал. 2019. №5 (371). Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/semenoshenie-i-struktura-shishek-u-klonov-mutatsionnyh-vedminyh-metel-keadra-sibirskogo>
- 14 Polyakova, O.; Goroshkevich, S.; Zhuk, E. Cone structure and seed development in grafted witches' broom and normal crown clones from the same trees of *Pinus sibirica*. *New Forests* 2019, 50(5), 805-819. <https://doi.org/10.1007/s11056-018-09700-x>
- 15 Zhuk, E.; Vasilyeva, G.; Goroshkevich, S. Witches' broom and normal crown clones from the same trees of *Pinus sibirica*: a comparative morphological study. *Trees* 2015, 29, 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1187-2>
- 16 Ямбуров, М. С., Горошкевич, С. Н., Третьякова, И. Н., Хихлова, О. В., & Лукина, А. В. Ведьмины мётлы мутационного типа как перспективный источник для получения новых декоративных форм хвойных растений.

- Вестник ИпГЦХА* 2011, (44-4), 153-160.
- 17 Yamburov, M.; Prokopyev, A.; Astafurova, T.; Ponkratyeva, S. The Development of Mutational Witches' Brooms In Scotch Pine (*Pinus sylvestris*). *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* **2016**, 18(4), 911–917.
- 18 Yan C.-F.; Gessler A.; Rigling A.; Dobbertin M.; Han X.-G.; Li M.-H. Effects of mistletoe removal on growth, N and C reserves, and carbon and oxygen isotope composition in Scots pine hosts. *Tree Physiology.* **2016**, 36(5), 562–575.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpw024>
- 19 Ozturk, M.; Coskuner, K.; Usta, Y.; Serdar, B.; Bilgili, E. The effect of mistletoe (*Viscum album*) on branch wood and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*). *IAWA Journal.* **2019**, 40(2), 352-365.  
<https://doi.org/10.1163/22941932-40190219>
- 20 Yamburov, M.; Romanova, S.; Prokopyev, A. Pollen morphological features of mutational witches' broom in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Ukrainian Journal of Ecology.* **2017**, 7(4), 234–239. [https://doi.org/10.15421/2017\\_111](https://doi.org/10.15421/2017_111)
- 21 Sonesson, C.; Love, M.; Robinson, M. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res.* **2015**, 4: 1521. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.2>
- 22 Corchete, L.; Rojas, E.; Alonso-López, D.; Las Rivas, J.; Gutiérrez, N.; Burguillo, F.. Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 19737.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76881-x>
- 23 Costa-Silva, J.; Domingues, D.; Lopes, F. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE.* **2017**, 12(12): e0190152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
- 24 McDermaid, A.; Monier, B.; Zhao, J.; Liu, B., Ma, Q. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Briefings in Bioinformatics.* **2019**, 20(6): 2044–2054. <https://doi.org/10.1093/bib/bby067>

- 25 Rodriguez-Esteban, R.; Jiang, X. Differential gene expression in disease: a comparison between high-throughput studies and the literature. *BMC Med. Genomics*. **2017**, 10, 59. <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0293-y>
- 26 Kvam, V.; Liu, P.; Si, Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. *American Journal of Botany*. **2012**, 99: 248-256. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100340>
- 27 Xiao, F.; Zhao, Y.; Wang, X.; Yang, Y. Targeted Metabolic and Transcriptomic Analysis of *Pinus yunnanensis* var. *pygmaea* with Loss of Apical Dominance. *Current Issues in Molecular Biology*. **2022**, 44(11), 5485–5497. <https://doi.org/10.3390/cimb44110371>
- 28 Cai, K.; Zhou, X.; Li, X.; Kang, Y.; Yang, X.; Cui, Y.; Li, G.; Pei, X.; Zhao, X. Insight Into the Multiple Branches Traits of a Mutant in *Larix olgensis* by Morphological, Cytological, and Transcriptional Analyses. *Front. Plant Sci*. **2021**, 12: 787661. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787661>
- 29 Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, Y.; Glöckner, F. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. **2013**, 41(D1): D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- 30 Haas, B.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P.; Bowden, J.; Couger, M.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; Macmanes, M.; Ott, M.; Orvis, J.; Pochet, N.; Strozzi, F.; Weeks, N.; Westerman, R.; William, T.; Dewey, C.; Henschel, R.; Leduc, R.; Friedman, N.; Regev, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc*. **2013**, 8(8): 1494-1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- 31 Simão, F.; Waterhouse, R.; Ioannidis, P.; Kriventseva, E.; Zdobnov, E. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **2015**, 31(19): 3210-3212.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>

- 32 Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; Li, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. **2012**, 28(23):3150-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- 33 Patro, R.; Duggal, G.; Love, M. I.; Irizarry, R. A.; & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. **2017**, 14(4): 417-419.
- 34 Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. **2014**, 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 35 Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- 36 Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- 37 Brasil, J. N., Costa, C. N. M., Cabral, L. M., Ferreira, P. C., & Hemerly, A. S. (2017). The plant cell cycle: Pre-Replication complex formation and controls. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 276-291. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0118>
- 38 Montagnoli A, Valsasina B, Brotherton D, Troiani S, Rainoldi S, Tenca P, Molinari A, Santocanale C. (2006). Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases. *J Biol Chem* 281:10281–10290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512921200>

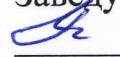
- 39 Yang, Z., Peng, Z., Yang, H. et al. Suppression Subtractive Hybridization Identified Differentially Expressed Genes in Pistil Mutations in Wheat. *Plant Mol Biol Rep* 29, 431–439 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0249-2>
- 40 Ni, D. A., Sozzani, R., Blanchet, S., Domenichini, S., Reuzeau, C., Cella, R., ... & Raynaud, C. (2009). The Arabidopsis MCM2 gene is essential to embryo development and its over-expression alters root meristem function. *New Phytologist*, 184(2), 311-322. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02961.x>
- 41 Bouchoucha, A., Waltz, F., Bonnard, G., Arrivé, M., Hammann, P., Kuhn, L., ... & Giegé, P. (2019). Determination of protein-only RNase P interactome in Arabidopsis mitochondria and chloroplasts identifies a complex between PRORP1 and another NYN domain nuclease. *The Plant Journal*, 100(3), 549-561. <https://doi.org/10.1111/tpj.14458>
- 42 Adams EHG, Spoel SH. The ubiquitin-proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity. *J Exp Bot*. 2018 Aug 31;69(19):4529-4537. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery216>
- 43 Pokhilko A, Ramos JA, Holtan H, Maszle DR, Khanna R, Millar AJ. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: A hypothesis. *J Theor Biol*. 2011 Feb 7;270(1):31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.11.021>
- 44 Shu K, Yang W. E3 Ubiquitin Ligases: Ubiquitous Actors in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Plant Cell Physiol*. 2017 Sep 1;58(9):1461-1476. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx071>
- 45 Sonoda Y, Sako K, Maki Y, Yamazaki N, Yamamoto H, Ikeda A, Yamaguchi J. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit. *Plant J*. 2009 Oct;60(1):68-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03932.x>
- 46 Thomann A, Brukhin V, Dieterle M, Gheyeselinck J, Vantard M, Grossniklaus U, Genschik P. Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant J*. 2005 Aug;43(3):437-48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02467.x>

- 47 Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol.* 2004 Dec;8(6):610-6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.009>
- 48 Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 2007 Jan 12;315(5809):201-5. <https://doi.org/10.1126/science.1127085>
- 49 Komander, D., Clague, M. & Urbé, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550–563 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2731>
- 50 Paez Valencia, J., Goodman, K., & Otegui, M. S. (2016). Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annual review of plant biology*, 67, 309-335. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112242>
- 51 Heucken, N., and Ivanov, R. (2018). The retromer, sorting nexins and the plant endomembrane protein trafficking. *J. Cell Sci.* 131:jcs203695. <https://doi.org/10.1242/jcs.203695>
- 52 Gao, C. J., Zhuang, X., Shen, J. B., and Jiang, L. W. (2017). Plant ESCRT Complexes: moving beyond endosomal sorting. *Trends Plant Sci.* 22, 986–998. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.003>
- 53 Jahn, R., Scheller, R. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631–643 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- 54 Yun, H. S., & Kwon, C. (2017). Vesicle trafficking in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 40, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.001>

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 И.Е. Мокш

подпись                      инициалы, фамилия

« 20 » июль 2024 г.


**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

06.04.01 Биология

06.04.01.06 Геномика и биоинформатика

Изучение генетических механизмов нарушения доминирования  
апикального роста деревьев

Научный руководитель

 19.06.24

подпись, дата

проф., к.б.н

должность, ученая степень

К.В.Крутовский

инициалы, фамилия

Выпускник

Э.Е. 19.06.24

подпись, дата

Э.Е.Бауэр

инициалы, фамилия

Рецензент

 19.06.2024

подпись, дата

проф., д.б.н

должность, ученая степень

Ю.Л.Орлов

инициалы, фамилия

Красноярск 2024