

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

И. Е. Ямских

« _____ » _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Сравнительная транскриптомика сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. с различным уровнем фитопатогенности»

04.06.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный руководитель	_____	<u>проф., к. б. н.</u>	<u>Крутовский К.В.</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Аксенова А.И.</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>с.н.с, д. б. н.</u>	<u>Литовка Ю.А.</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2020

АННОТАЦИЯ

Магистерская диссертация на тему «Сравнительная транскриптомика сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. с различным уровнем фитопатогенности» содержит 43 страницы текстового документа, 66 использованных источников, 14 рисунков и 6 таблиц.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТРАНСКРИПТОМИКА, ГРИБНЫЕ ТРАНСКРИПТОМЫ, РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ФИТОПАТОГЕНЫ, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ.

Целью исследования является обнаружение генов, ответственных за фитопатогенность путём сравнительного анализа транскриптомов и дифференциальной экспрессии генов сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* с различным уровнем фитопатогенности.

Объектом исследования являются РНК-последовательности сибирских штаммы грибов *H. annosum*.

Актуальность исследования состоит в том, что в настоящее время отсутствуют данные о генах фитопатогенности *H. Annosum*, и сравнительные исследования транскриптомных данных для *H. annosum* (Fr.) Bref. ранее не проводились.

По результатам работы были получены 2 транскриптомные сборки *H. annosum* (Fr.) Bref. с различным уровнем фитопатогенности, проведен сравнительный транскриптомный анализ, а также предварительный анализ дифференциальной экспрессии генов.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы	7
1.1 Виды грибов рода <i>Heterobasidion</i>	7
1.2 Патогенность грибов рода <i>Heterobasidion</i>	8
1.3 Способы инфицирования грибов рода <i>Heterobasidion</i>	11
1.4 Анализ данных транскриптома	13
2 Материалы и методы	16
2.1 Видовая идентификация штаммов грибов <i>H. annosum</i>	16
2.2 Исходные данные для транскриптомной сборки	20
2.3 Оценка качества секвенирования и фильтрация рибосомальной РНК	21
2.4 Сборка транскриптомов	22
2.5 Аннотация транскриптомов и анализ дифференциальной экспрессии генов	25
3 Результаты и обсуждение	27
3.1 Сборка и аннотация транскриптомов	27
3.2 Аннотация транскриптомов	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов ..	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	29
Список используемой литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Корневая и комлевая гниль, вызванная грибами комплекса *H. annosum* s. l. приводит к серьезным экономическим потерям лесного хозяйства. Финансовые потери, вызванные данным видовым комплексом в Европе, оценивается в 800 миллионов евро в год [1]. Несмотря на это механизмы фитопатогенности и биологической активности штаммов *H. annosum* s. l. в настоящее время изучены недостаточно.

Хвойные деревья являются ключевыми видами и включают в себя некоторые из наиболее важных видов деревьев в северном полушарии. Пиломатериалы из хвойных пород составляют основу для одной из крупнейших отраслей промышленности в Европе, доход от экспорта которой составляет миллиарды евро в год, а стоимость в глобальном масштабе оценивалась в 370 миллиардов долларов. Таким образом, последствия, вызываемые грибными патогенами становятся все более повсеместными и значительными [2]. Одно из самых разрушительных хвойных заболеваний - корневая и комлевая гниль, вызванная главным образом базидиомицетами (Allen et al., 1996), включая *Heterobasidion annosum*, *Armillaria spp.* (Shaw and Kile, 1991) и *Phellinus spp.* (Hansen and Goheen, 2000) [3]. В Южной Европе и в бассейне Средиземного моря эти патогены особенно вредны для австрийской сосны, вызывая деструкцию растущих побегов и гибель деревьев, но это происходит и на других видах сосны, включая *P. pinea*.

Экстремальные факторы окружающей среды способствуют развитию фитопатогенов, усугубляют и ускоряют заражение, вызывают древесное усыхание [4].

Проблема сохранения лесных массивов очень актуальна на сегодняшний день. Помимо экономического значения, хвойные леса оказывают колоссальное влияние на экологию и климат, играют важную

биологическую роль в поддержании минерального баланса в бореальных лесных экосистемах, а также участвуют в глобальном углеродном цикле.

Важность изучения фитопатогенных грибов обусловлена тем, что полученные знания могут существенно помочь в создании эффективных геномных методов селекции, необходимых для решения проблем сохранения лесных генетических ресурсов.

Помимо прочего, грибы являются богатым источником вторичных метаболитов и представляют интерес для людей на протяжении тысяч лет. Грибы рода *Heterobasidion* способны продуцировать вторичные метаболиты-фоманноксины, фомманозины, фомаджорины и др. Фоманноксин и фоманнозин обладают антибактериальной, антифунгальной и фитотоксичной активностью [5]. Кроме того, выявлено, что фоманноксин играет роль ингибитора биосинтеза бета-амилоидного пептида, вовлеченного в развитие болезни Альцгеймера [6].

Работы по изучению генетической составляющей корневой губки, их биологической активности и связи с фитопатогенностью единичны [7]. На сегодняшний день нет достоверных данных о вторичных метаболитах у сибирских штаммов грибов *Heterobasidion* и их транскриптомных данных.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования заключается в обнаружении генов, ответственных за фитопатогенность путём сравнительного анализа транскриптомов и дифференциальной экспрессии генов сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* с различным уровнем фитопатогенности.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- анализ фитопатогенных данных;
- обработка нуклеотидных данных РНК-секвенирования;
- сравнительный транскриптомный анализ, включая анализ дифференциальной экспрессии генов;
- аннотация транскриптомов.

Практическая значимость. Исследование сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. имеет ценность для лесной геномики и сельского хозяйства, так как позволяет приблизиться к пониманию механизмов фитопатогенности. В результате работы были получены данные о 2 транскриптомных сборках грибов *Heterobasidion annosum* и первичные данные о генах, ответственных за фитопатогенность.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены на Шестой международной конференции-совещании «Сохранение лесных генетических ресурсов» в 2019 г. (г. Щучинск, Республика Казахстан) (<http://kazniilha.kz/content/6-ya-meghdunarodnaya-konferenciya-soveschanie-sohranenie-lesnyh-geneti>)

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность И. Н. Павлову и сотрудникам его лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии института леса СО РАН за предоставленные образцы, Н. В. Орешковой за РНК-секвенирование, В. В. Шарову за содействие в организации предварительной обработки данных, а также другим сотрудникам и аспирантам кафедры геномики и биоинформатики за ценные советы и помощь в освоении программного обеспечения. Отдельную благодарность хотелось бы выразить своему научному руководителю, профессору К. В. Крутовскому за ценные указания и курирование на всех этапах работы.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории лесной геномики СФУ и кафедры геномики и биоинформатики (зав. каф. д. б. н. И. Е. Ямских) в рамках проекта «Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации» финансируемого Правительством РФ (договор №14.У26.31.0004) и частичном по базовым проектам ФИЦ КНЦ СО РАН № 0356-2019-0024 и № 0287-2019-0002.

1 Обзор литературы

1.1 Виды грибов рода *Heterobasidion*

Грибы рода *Heterobasidion* являются одними из самых интенсивно изучаемых, поскольку большинство видов этого рода являются деструктивными лесными патогенами. Эти патогенные виды широко распространены и вызывают корневую и комлевую гниль у более чем 200 (преимущественно хвойных) растений [8]. Род *Heterobasidion* имеет широкое распространение и является важным экологическим фактором, связанным с круговоротом питательных веществ, регенерацией лесов и их сукцессией [9].

В настоящее время в составе комплекса *H. annosum* признаны пять видов: *H. abietinum* Niemelä & Korhonen, *H. parviporum* Niemelä & Korhonen, *H. annosum* sensu stricto (s.s.) (Fr.) Bref., *H. irregulare* Garbel. & Otrosina и *H. occidentale* Otrosina & Garbel. (Otrosina and Garbelotto 2010). Виды этого комплекса различаются морфологически, генетически, экологически и географически между собой. *H. abietinum*, *H. parviporum* и *H. annosum* распространены в Евразии, виды *H. irregulare* (Underw.) Garbelotto & Otrosina и *H. occidentale* Otrosina & Garbelotto населяют Северную Америку [10]. В Сибири представителями рода являются *H. annosum* и *H. abietinum* [11].

Сильный вред корневая губка наносит насаждениям *Pinus sylvestris* L. в Минусинском районе Красноярского края, а также в Алтайском крае [12, 13]. Грибы *Heterobasidion* являются эндофитами и сапронекротрофными фитопатогенами.

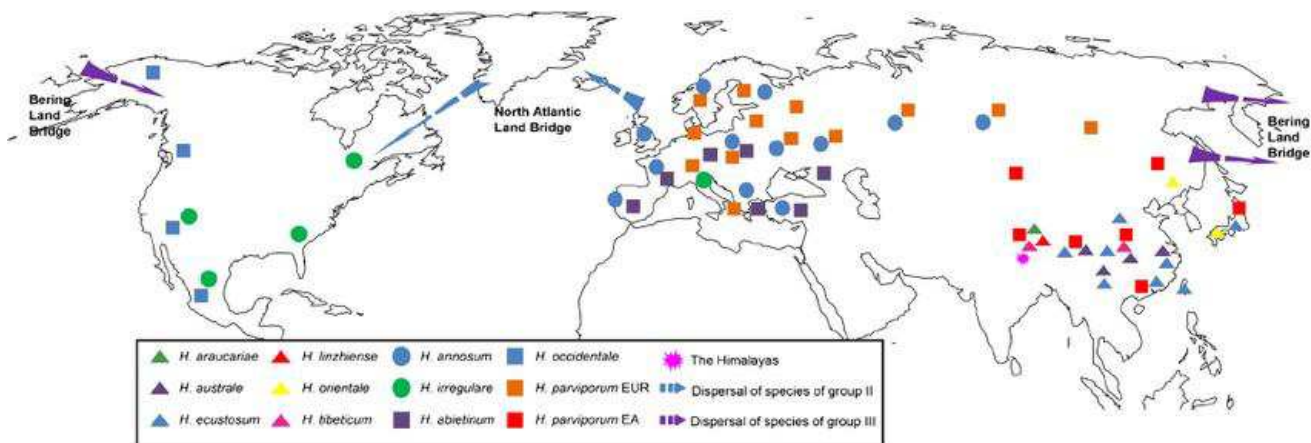


Рисунок 1 – Карта географического распространения грибов рода *Heterobasidion* в северном полушарии [14].

1.2 Патогенность грибов рода *Heterobasidion*

Грибы в пределах видового комплекса *Heterobasidion annosum* sensu lato (s.l.) являются агрессивными растительными патогенами, которые вызывают корневую гниль, и тем самым являются проблемой для лесного хозяйства. В основном они влияют на хвойные породы. Снижение роста, разрушение внутренних частей стебля приводит к девальвации древесины, повышенным ветрам и, в худшем случае, смертности деревьев.

H. annosum s.l. с момента своего открытия в 1821 году Элиасом Фрисом, был известен под разными названиями, от *Polyporus annosus* и *Fomes annosum* до названий, связанных с предпочтительным растением-хозяином [15].

Виды *Heterobasidion* могут быть как сапротрофными, так и некротрофными патогенами. *Heterobasidion* отличаются от других грибов тем, что сапротрофная фаза может возникать как до, так и после некротрофной [16]. Для видов *Heterobasidion*, в основном паразитирующих на *Pinus*, большинство первичных инфекций происходит, когда грибы колонизируют пни сосны. Колонизированные пни впоследствии становятся основным источником инфекций для соседних деревьев через прямое заражение вдоль взаимосвязанных корневых систем.

H. abietinum встречается в основном в районе Средиземного моря и заражает хвойные виды рода *Abies*. *H. parviporum* и *H. annosum* встречаются в северной Европе, заражая в основном ель обыкновенную и сосну обыкновенную, соответственно [17].

О механизмах действия некротрофных грибковых эффекторов известно очень мало. Грибы-некротрофы исторически считались неспециализированными растительными патогенами, которые могут секретировать только ферменты, разрушающие клеточную стенку (CWDE), чтобы вызвать неспецифическую гибель клеток путем нарушения целостности клеточной стенки растения [18]. Тем не менее, ряд доказательств указывает на то, что некротрофные грибы могут продуцировать и секретировать специфические белки, которые взаимодействуют с компонентами иммунной системы растений. В частности, некротрофные грибы могут секретировать специфические для хозяина токсины (HST), которые определяются как некротрофические эффекторы [19, 20]. Много из того, что известно об этих эффекторах, связано с исследованиями патогенов культур *Stagonospora nodorum* и *Pyrenophora tritici-repentis*, которые являются двумя некротрофическими грибами пшеницы. Первым HST, который был описан, был ToxA, фактор патогенности *P. tritici-repentis*, который ответственен за некротрофический рост грибов у пшеницы (*Triticum aestivum*) [21]. Не так много литературы, описывающей некротрофические эффекторы, и большая часть доступной информации в основном связана с возбудителями сельскохозяйственных культур.

Недавно был полностью секвенирован *H. irregulare* TC 32-1, который был первым секвенированным лесным фитопатогеном базидиомицетов [22]. Благодаря этому полногеномное исследование позволило идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), связанные с грибной вирулентностью [23]. Транскриптомное профилирование стало более информативным благодаря использованию генных моделей из

таксономически близких видов, что привело к активизации исследований, связанных с экспрессией генов [24, 25, 26].

Считается, что более частые засухи, вызванные глобальным потеплением, приведут к увеличению частоты появления патогенов деревьев, главным образом через косвенное воздействие на физиологию хозяина [27]. Более засушливые условия могут оказывать прямое воздействие на патогены, как показывают инвазивные экзотические виды *H. irregulare* в центральной Италии, которые, по-видимому, лучше приспособлены к расселению в средиземноморском климате, чем местные виды *H. annosum* [28]. Колебания температуры и режимов осадков из-за изменения климата могут преобразовать стадию роста, скорость развития и патогенность инфекционных агентов, а также физиологию и устойчивость растения-хозяина [29].

Смена климата – это не просто постепенное повышение или понижение температуры или изменение количества осадков, это явление приводит к непредсказуемым кратковременным изменениям погоды и экстремальным явлениям. Это может изменить вероятность распространения, размножения и эпидемий патогенных микроорганизмов в новых районах. Например, цитрусовый рак [30], бактериальная болезнь, передающаяся через воду, стали главенствующими заболеваниями во Флориде после того, как четыре урагана обрушились на берег в 2004 году, и было обнаружено, что вспышки игольной болезни *Dothistroma* коррелируют с уровнем осадков в Британской Колумбии [31]. Morley и Lewis (2014) изучали воздействие на патогены засухи, которая затронула Великобританию в 1976 году. У грибов эти эффекты зависели от патогенного образа жизни: многие листовые патогены были менее успешными в производстве воздушных спор, в то время как переносимые из почвы виды в основном не пострадали [32]. Другие исследователи попытались охарактеризовать вклад экстремальных погодных явлений и вспышки болезней во всем мире и объяснили изменение

производительности сельского хозяйства на 10–80% экстремальными погодными условиями [33, 34].

Влага может по-разному воздействовать как на растение-хозяина, так и на патогенные микроорганизмы. Некоторые патогенные микроорганизмы, такие как парша яблони, с большей вероятностью заражают растения с повышенным содержанием влаги, поскольку прогнозируемые модели этих заболеваний основаны на измерениях влажности листьев, относительной влажности температуры и осадков. Другие патогенные микроорганизмы, такие как виды мучнистой росы, имеют тенденцию процветать в условиях низкой влажности [35]. Выявлено, что стресс, вызванный засухой, влияет на частоту и серьезность таких вирусов, как MDMV и BYV. Более частые и экстремальные явления осадков, которые предсказываются некоторыми моделями изменения климата, могут привести к более длительным периодам с благоприятной средой для патогенных микроорганизмов.

1.3 Способы инфицирования грибов рода *Heterobasidion*

Механизм заражения деревьев *H. annosum* s. l. представлен инфицированием смешанного типа [2]. Заражение происходит воздушно-капельным путем, преимущественно базидиоспорами на поврежденных деревьях. Базидиоспоры инфицируют поверхность пня или раны стебля и корня при температуре от 5 до 35 ° C. Базидиоспоры прорастают и колонизируют пни, включая корни. Полученный мицелий может долго жить в пнях, не вызывая болезней на живом дереве. Гриб распространяется от пней к здоровым деревьям путем роста мицелия через корневые трансплантаты или контакты (рис. 2).

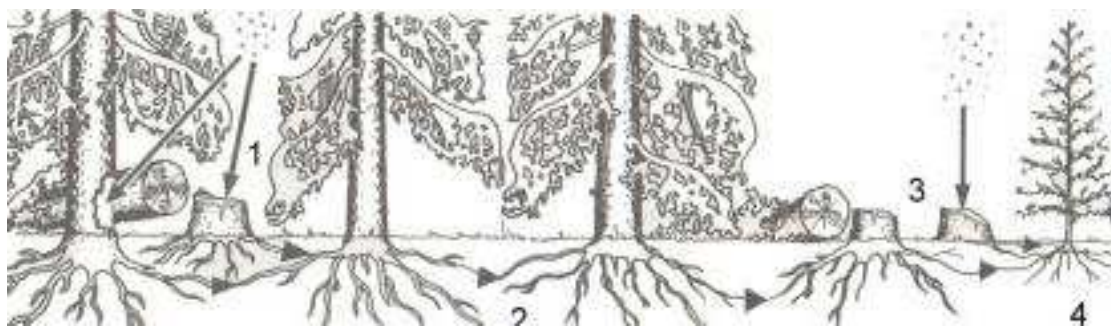


Рисунок 1 – Заражение базидиоспорами свежесрубленной культуры

[36]

Только иногда колонизация происходит через тонкие корни. Гриб распространяется некротрофно в заболони на живых деревьях, но позже растет в сердцевине большинства видов деревьев, несмотря на присутствие фунгистатических соединений. Он производит широкий спектр ферментов распада древесины и нескольких токсинов: фомманоксин, фомманозин, фомманоксиновая кислота, ооспонол и ооспогликоль [37]. Несколько поздних морфологических и химических реакций активируются у хозяина на поздних стадиях инфекции, включая продуцирование ряда фенольных соединений, которые могут повредить грибковые мембраны, лигнификацию, которая предотвращает диффузию токсинов и ферментов, также происходит суберизация и образование сосочков. Производятся нелетучие терпены, а смолы являются механическими барьерами [38].

В зависимости от времени года, содержания влаги в заболони, возраста и жизнеспособности дерева, *H. annosum* может распространяться со скоростью до 1–2 м в год в стеблях и корнях соответственно. Неизвестно, как долго колония может оставаться живой на одном и том же участке, но некоторые способны держать очаги заболеваний диаметром 50 м, которые, вероятно, могут быть старше 100 лет; патогенное заражение было обнаружено в пнях через 62 года после рубки и в корневых системах больных деревьев в течение нескольких десятилетий [39, 40].

Стратегии борьбы с корневой гнилью *H. annosum* включают использование химических веществ, агентов биологического контроля и

методик лесоводства. Химические и биологические методы контроля предполагают нанесение веществ на пни после рубки. Мочевина и бораты являются химическими веществами, используемыми в промышленности для контроля. Посадка видов с низкой восприимчивостью может уменьшить проблемы с корневой гнилью.

1.4 Анализ данных транскриптома

Технологическая революция в секвенировании следующего поколения (NGS) предоставила беспрецедентные возможности для изучения любого организма, представляющего интерес на геномном или транскриптомном уровне. Сборка транскриптома является важным первым шагом для изучения молекулярной основы интересующих фенотипов с использованием РНК-секвенирования (RNA-Seq).

Использование технологий NGS резко возросло за последнее десятилетие [41]. Из-за технологической революции в NGS накапливается огромное количество как транскриптомных, так и геномных последовательностей у широкого спектра видов, особенно в крупномасштабных проектах, включая Genome 10 K [42] и Insect 5 K [43]. Традиционно, модельные организмы выбирались в значительной степени на основе доступности (те, которые можно выращивать в лаборатории и использовать для генетических исследований) или их эволюционной связи с человеком. Однако в нынешнюю эпоху «-омики» можно изучать гораздо большее разнообразие организмов на геномном и транскриптомном уровне.

RNA-Seq используется для реконструкции и количественного определения целых транскриптомов [44, 45, 46]. Таким образом, RNA-Seq позволяет идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены, даже если нет доступного эталонного генома: короткие чтения, производимые системами *Illumina*, могут быть собраны в контиги [45]. В

идеале каждый контиг соответствует определенной изоформе транскрипта.

На первый взгляд, процесс сборки транскриптома похож на сборку генома, но на самом деле существуют фундаментальные различия и проблемы. С одной стороны, некоторые транскрипты могут иметь низкий уровень экспрессии, в то время как другие имеют высокую экспрессию [44, 47]. У эукариот многие гены производят несколько транскриптов (изоформ) в результате альтернативного сплайсинга [45]. Короткие нуклеотидные сиквенсы (прочтения), полученные при секвенировании, могут быть частью нескольких путей в графе сборки. Следовательно, структура графа может быть неоднозначной, и представленные изоформы могут вызывать сложности при трактовке. Кроме того, некоторые варианты транскриптов с низким уровнем экспрессии могут рассматриваться различными инструментами как ошибки и удалены из процесса сборки [48]. Как и при сборке генома, повторяющиеся области также являются серьезной проблемой для сборки транскриптомов [49]. Проблема сборки становится еще более сложной, поскольку транскриптом варьирует в зависимости от типа клеток, условий окружающей среды и времени. Успешный выбор ассемблера для сборки должен решить все эти проблемы и быть в состоянии восстановить транскрипты полной длины с различными уровнями экспрессии.

De novo сборка транскриптомов немодельных организмов в последнее время находится на подъеме, стимулируя разработку новых биоинформатических методов и компьютерных программ. Однако, в настоящее время стоит вопрос о том, какое программное обеспечение и какие настройки параметров следует использовать для создания хорошей сборки. Нет единого мнения о том, какие параметры следует использовать для оценки качества множественных сборок транскриптомов *de novo*.

В последнее десятилетие было разработано несколько программ специально для сборки транскриптома *de novo* [50, 51]. Некоторые из них созданы поверх уже существующих программ сборки генома [52,53];

другие были специально разработаны для сборки транскриптома [54]. Более серьезная проблема заключается в наличии вставок различных размеров, а также в различии длины чтения и содержании белковые и / или некодирующих стенограмм.

В настоящее время не существует оптимальной программы сборки для всех наборов данных RNA-Seq. Различные виды, протоколы секвенирования и настройки параметров требуют различных подходов и корректировок базовых алгоритмов для получения наилучших возможных результатов. Тем не менее, знание преимуществ и недостатков каждой программы является важным шагом в направлении алгоритма автоматической оценки и объединения для нескольких транскриптомных сборок *de novo*.

Дифференциальная экспрессия генов относится к анализу и интерпретации различий в количестве транскриптов генов в транскриптоме [55]. Списки генов, которые различаются между двумя наборами образцов, часто предоставляются инструментами анализа данных RNA-seq или могут генерироваться вручную путем статистического тестирования наборов данных. Из-за большого количества тестируемых генов (например, > 20000 в геноме человека) обычно применяется множественная поправка Бонферрони [56]. Поскольку генам, которые по-разному экспрессируются между образцами необходим метод для понимания и интерпретации значения столь многих вариаций экспрессии генов, одним из способов решения этой проблемы является «обогащение генного набора» или GSE (Hung et al., 2012; Subramanian et al., 2005). В этом методе ген или группа генов, которые принадлежат определенной категории и которые обогащены в одном образце, сравниваются с другим образцом. Аннотации генной онтологии (GO) предоставляют еще один метод аннотирования и группировки генов [57, 58].

2 Материалы и методы

2.1 Видовая идентификация штаммов грибов *H. annosum*

Объектами исследования служили штаммы 45-2 и К-На-4 вида *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия).

Штаммы были изолированы в чистую культуру в 2014 и 2018 гг. из соответствующих базидиом, расположенных на древесине *Pinus sylvestris* L. (Красноярский край). Выделение осуществляли путем раскладки фрагмента плодового тела во влажную камеру и методом спорового отпечатка и на селективные питательные среды – мальт-экстракт-агар (МЭА); МЭА с 0.5% танина; Норкранс-агар (НРКА) (рис. 3) [59].



Рисунок 1 – Изолирование в чистую культуру штаммов грибов *H. annosum* на мальт-экстракт агаре с танином (внизу) из базидиом, произрастающих на живых деревьях (вверху)

Хранение культур осуществлялось на скошенном МЭА при 6°C. Морфологические признаки изучали у грибов, выращенных на морковном агаре, МЭА и НРКА при 24 ± 1°C. Микроструктуры оценивали методами фазово-контрастной и светопольной микроскопии с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse Ci с системой

фотодокументации (“Nikon”, Япония) и электронного сканирующего микроскопа Hitachi SEM TM-1000 с 10000 кратным увеличением и разрешением 30 нм (“Hitachi Ltd.”, Япония).

Видовую идентификацию штаммов верифицировали молекулярно-генетическими методами. Секвенирование участков генетических маркеров ITS (*internal transcribed spacer*) и TEF-1alpha (*transcription elongation factor 1-alpha*) проводили на секвенаторе Illumina MySeq (“Illumina”, США) с использованием оборудования ЦКП “Инновационные технологии защитстений” Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург-Пушкин, Россия) и ЦКП “Геномика” (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Микроструктуры. Исследуемые штаммы на среде НРКА формировали хорошо развитый воздушный мицелий с полупрозрачными, тонкостенными генеративными гифами с септами. Ширина гиф 1,5–5,0 мкм; ветвление под острым, реже – под прямым углом, простое, от умеренного до среднего. Анастомозы умеренные, протяженностью от 2 до 40 мкм. Пряжки размером 2,0–5,5 мкм, редкие, простые, расположенные на прямой широкой гифе. Конидиофоры с апикальной везикулой; прямостоячие, простые, гиалиновые; до 200 мкм длиной и 4-10 мкм в диаметре. Диаметр апикальной везикулы 6-15 мкм, поверхность с коническими зубцами, на которых располагаются одноклеточные, гладкие, гиалиновые конидии яйцевидной формы; 3.5–8.0 × 2.5–6.5 мкм (рис. 24) [60].

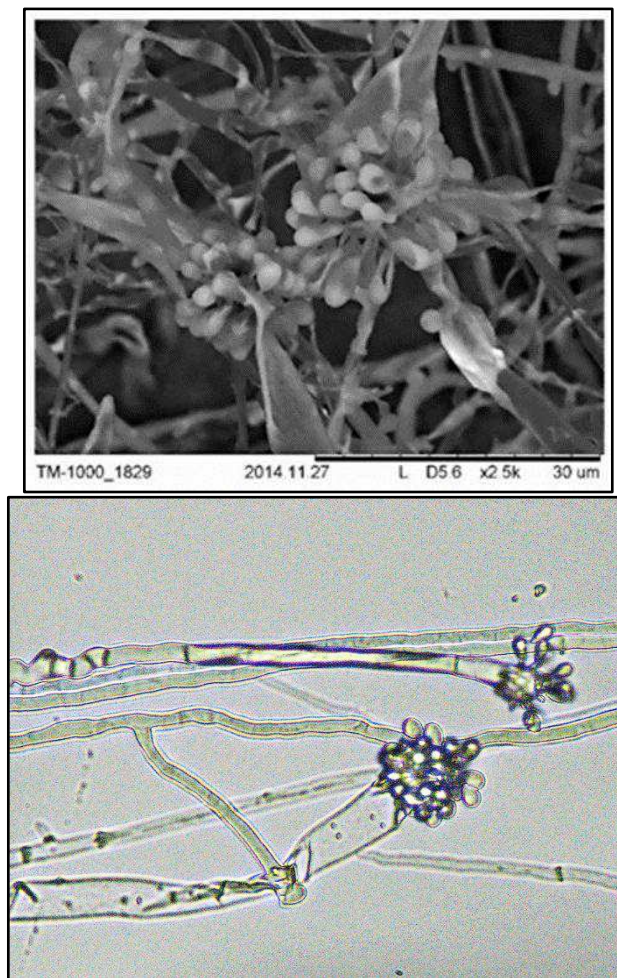


Рисунок 2 – Микроструктуры штамма 45-2 *Heterobasidion annosum*, исследованные методами сканирующей электронной микроскопии (А-слева, увеличение x2500, мицелий) и светопольной микроскопии (В-справа, увеличение x1500, апикальная везикула с конидиями).

Культуральные особенности. Исследуемые штаммы при 22 °С на натуральной среде (морковный агар) формируют колонии с хорошо развитым воздушным мицелием белого, реже, светло-бежевого цвета (рис. 5А). Реверс колонии не окрашен, пигмент не образуется. Радиальная скорость роста штаммов 45-2 и К-На-4 составила 3,3 и 5,2 мм/сут соответственно на седьмые сутки культивирования; ростовой коэффициент – 84 и 155. При изменении натурального состава питательной среды на синтетический морфология колоний существенно не отличалась (рис. 5Б). Радиальная скорость роста штаммов 45-2 и К-На-4 на среде Норкранс составила 4,9 и 4,2 мм/сут соответственно; ростовой коэффициент – 190 и

76. Снижение температуры до 10 °С привело к закономерному замедлению ростовых процессов; отмечены морфологические изменения плотности и цвета колонии (рис. 5В).

При культивировании штаммов на мальт-экстракт агаре при 22 °С не отмечено существенных морфологических отличий: культуры образуют характерные колонии белого цвета с легким оттенком слоновой кости или светло-бежевого цвета. Воздушный мицелий ватообразный, пушистый; его высота варьирует в пределах 4–11 мм (рисунок 5 Г, Д). При старении культуры (более 6 недель) в отдельных случаях формируется плотный кожистый слой различных оттенков коричневого цвета (рисунок 5Е) и экссудат; реверс темно-коричневый [61].

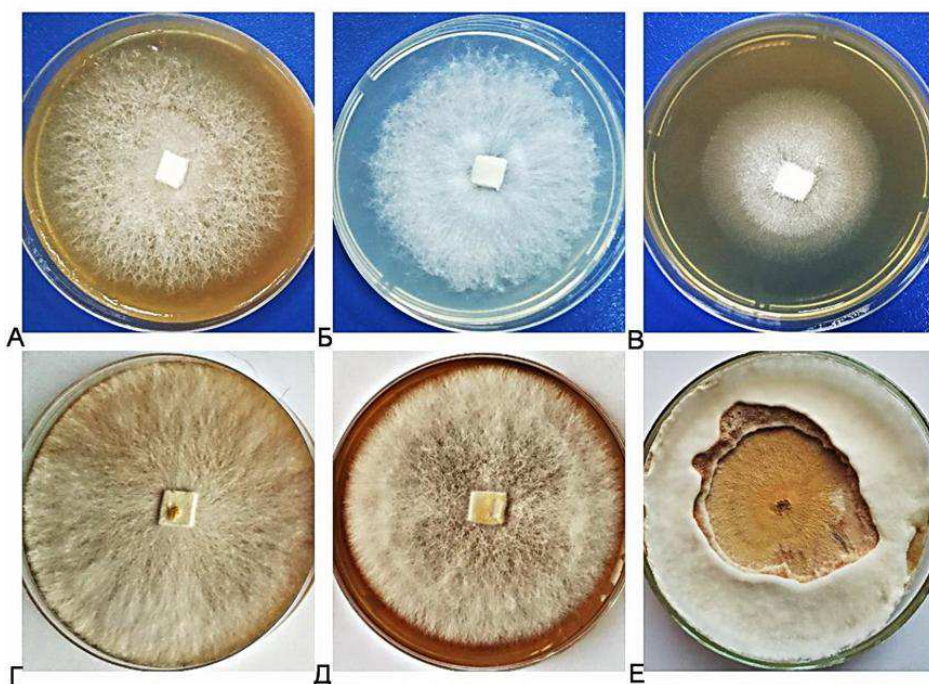


Рисунок 3 – Культурально-морфологические особенности штамма 45-2 *Heterobasidion annosum in vitro*

Фитопатогенность *in vitro* оценивали при культивировании моноспоровых культур на твердой и полужидкой питательных средах. В первом случае семена *Pinus sylvestris* раскладывали на поверхность 10-ти суточной культуры на мальт-экстракт агаре в чашки Петри; инкубировали в климатоканере при температуре 20–22 °С в течение 28 суток и оценивали

жизнеспособность (%); длину главного корня и стебля здоровых проростков (мм); степень поражения проростков (баллы); жизнеспособность выживших растений на свежей культуре гриба (%). Во втором эксперименте проростки с длиной корня 1,5–2,5 см размещали на поверхности 10-ти суточной культуры гриба таким образом, чтобы корни были погружены в полужидкую среду Норкранс. Посевы инкубировали в климатокамере при 20–22 °С с 12-ти часовым фотопериодом в течение 21 сут и оценивали жизнеспособность растений (%); длину надземной части здоровых проростков (мм); степень поражения проростков (баллы).

По результатам двух исследований были отобраны моноспоровые культуры с максимальными и минимальными фитопатогенными свойствами. Наиболее вирулентный штамм вызывал некротические поражения корневой системы и 100 %-ю гибель опытных растений на 8-10 сутки вегетации. Под действием моноспоровой культуры с минимальной вирулентностью отмечено замедление развития главного корня и надземной части у 34 % тест-растений, развитие локальных некрозов корневой системы у 47 % сеянцев, однако массовой гибели растений на 28 сутки вегетации не произошло, что свидетельствует об относительной устойчивости сеянцев *P. sylvestris* к исследуемому клону.

2.2 Исходные данные для транскриптомной сборки

РНК образцов была выделена из мицелия с помощью набора реактивов Plant/Fungi Total RNA Purification Kit компании Norgen Biotec Corp. Качество выделенной РНК проверяли на электрофоретической системе Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies с использованием чипов «RNA 6000 Nano Kit». Количество выделенной РНК измеряли при помощи Qubit с использованием Qubit RNA BR Assay Kit.

Высококачественная РНК в необходимом количестве (для протоколов Illumina оптимальная концентрация тотальной РНК должна составлять 0.1-1 µg) была использована для приготовления

транскриптомной библиотеки с использованием двух наборов: Poly-A селекция мРНК проводили с использованием NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module, преобразование мРНК в кДНК производили при помощи набора TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant Illumina. Секвенирование библиотек осуществляли на секвенаторе Illumina MiSeq, с использованием MiSeq Reagent Kit v3 (150 циклов).

2.3 Оценка качества секвенирования и фильтрация рибосомальной РНК

Для оценки качества данных секвенирования было использовано программное обеспечение FastQC, которое предоставляет набор инструментов для выходного контроля качества секвенирования (общий показатель качества секвенирования, GC-контент, наличие последовательностей адаптеров и т.д.). Удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством, производилось при помощи программы Trimmomatic [Bolger, Lohse, Usadel, 2014] в лаборатории лесной геномики СФУ, это программное обеспечение обладает высокой производительностью и подходит для обрезки данных низкого качества платформы *Illumina*. После фильтрации данные вновь проверялись при помощи программы FastQC.

Программа FastQC предоставляет набор инструментов для выходного контроля качества секвенирования (общий показатель качества секвенирования, GC-контент, наличие последовательностей адаптеров и т.д.).

Далее была проведена фильтрация рибосомальной РНК по метатранскриптомным данным. Фильтрация осуществлялась при помощи инструмента SortMeRNA версии 2.1, который может обеспечить высококачественное локальное выравнивание считываний рРНК по 8 базам данных рРНК [Kopylova, Noé, Touzet, 2012]. SortMeRNA работает с

данными Illumina, 454, Ion Torrent и PacBio и может производить SAM и BLAST-подобные выравнивания.

2.4 Сборка транскриптомов

Существует множество программ для сборки транскриптомов, в данном исследовании сборка данных осуществлялась при помощи трёх *de novo* ассемблеров – Trinity версии 2.8.4, запуск которого осуществлялся со стандартными параметрами [Grabherr, 2011], RNASpades версии 3.12.0 и сборщика, встроенного в CLC Genomic Workbench.

Trinity - это автономное программное обеспечение, состоящее из трех основных модулей: (1) Inchworm, который сначала генерирует контиги транскрипта; (2) Chrysalis, для их кластеризации и построения полных графов де Брейна для каждого кластера; (3) Butterfly, который обрабатывает отдельные графы параллельно, что в итоге приводит к реконструкции последовательности транскриптов (рис. 4).

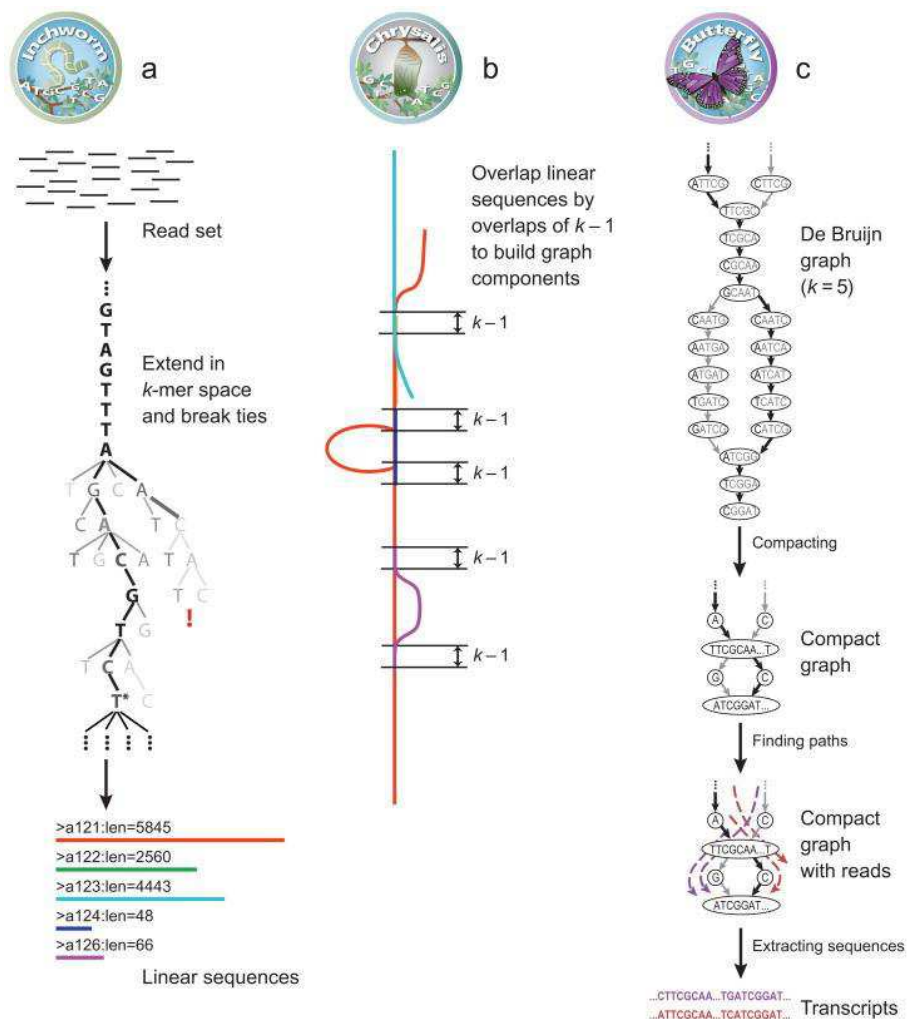


Рисунок 4 – Схема действий программы Trinity (a – Inchworm, b – Chrysalis, c – Butterfly) [62]

RnaSPAdes - это сборщик транскриптомов *de novo*, основанный на SPAdes (рис. 5). Он был в основном протестирован на данных Illumina RNA-Seq, включая данные, также поддерживает считывания IonTorrent RNA. Начиная с версии SPA4 3.14 он также поддерживает гибридную сборку из коротких и длинных прочтений, например, PacBio Iso-seq или Oxford Nanopore RNA.

Однако rnaSPAdes обычно превосходит другие ассемблеры по такому важному свойству, как количество собранных генов и изоформ, и в то же время имеет более высокую статистику точности в среднем по сравнению с ближайшими конкурентами [63].

Ассемблер генома SPAdes состоит из следующих основных этапов: (1) построение сжатого графа де Брёйна; (2) упрощение графа, которое

подразумевает удаление химерных и ошибочных ребер; (3) отображение пар чтения на график сборки; и (4) повторение и создание сети, используя совмещенные парные операции чтения с алгоритмом exSPAnDer [64]. Хотя построение графика и отображение парных операций чтения не зависят от типа набора данных и не требуют изменений для данных RNA-Seq, упрощение графика и процедуры повторного разрешения сильно зависят от свойств геномных последовательностей и, таким образом, требуют значительных модификаций и новых функциональных возможностей для транскриптомной сборки *de novo*.

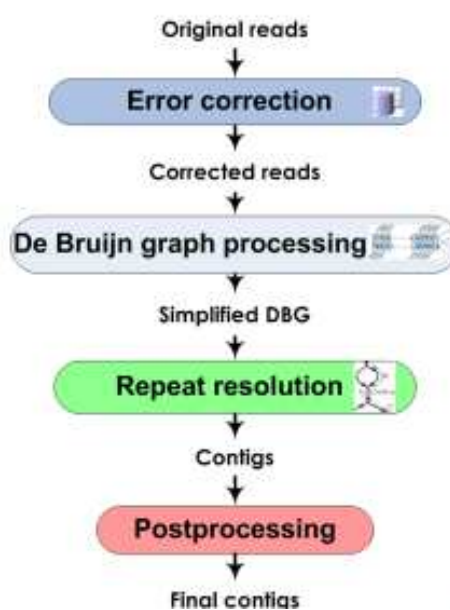


Рисунок 5 – Этапы работы ассемблера maSpades

CLC Genomics Workbench – это новое решение для анализа и визуализации данных секвенирования следующего поколения (NGS). Он включает в себя передовые технологии и алгоритмы, а также поддерживает и интегрируется с остальными типичными рабочими процессами NGS. CLC Genomics Workbench включает в себя все функции «CLC Main Workbench» (G6G Abstract Number 20096A) и возможность *de novo* сборки. CLC Genomics Workbench поддерживает как короткое, так и длинное чтение, поддерживает парное чтение и поддерживает данные

секвенирования Sanger, 454, Illumina Genome Analyzer, Helicos и SOLiD. Процесс сборки *de novo* состоит из двух этапов: во-первых, последовательности контиги создаются путем выравнивания всех чтений. Во-вторых, все чтения объединяются с использованием референсных последовательностей.

Для оценки качества сборки использовался веб-сервис *gVolante* со встроенным BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) версии 1.0 с базой данных Fungi, который производит оценку сборки и полноты аннотации с помощью однокопийных ортологов.

2.5 Аннотация транскриптомов и анализ дифференциальной экспрессии генов

Аннотация транскриптомов *Heterobasidion* осуществлялась с помощью программного обеспечения Blast2GO, комплексной биоинформатической программы для функциональной аннотации и анализа нуклеотидных последовательностей генома или транскриптома. По сути, Blast2GO использует локальный или удаленный поиск BLAST, чтобы найти последовательности, похожие на одну или несколько входных последовательностей.

Программа извлекает термины GO, связанные с каждым из полученных совпадений, и возвращает оцененную аннотацию GO запроса. Ферментные коды получают путем сопоставления из эквивалентных GO, в то время как мотивы InterPro напрямую запрашиваются в веб-службе InterProScan. GO-аннотацию можно визуализировать, восстанавливая структуру отношений генной онтологии.

Типичный базовый вариант использования Blast2GO состоит из 5 этапов: BLASTing, мэпирование, аннотирование, статистический анализ и визуализация.

Последовательности, полученные с помощью ассемблера RNASpades, были выравнены на нуклеотидную базу данных грибов

nr(Fungi) с e-value равным $1e-5$, используя алгоритм BLAST. Далее при помощи программы InterProScan, встроенной в Blast2GO, транскрипты, предварительно конвертированные в белковые последовательности, были проверены на наличие известных консервативных активных сайтов, доменов и повторов. Следующим этапом анализа данных стал поиск соответствий найденных гомологов с терминами генной онтологии (GO).

Для анализа экспрессии использовался пакет программ Tuxedo: Tophat2, Bowtie2 и Cufflinks [Trapnell, 2010] и пакеты языка программирования R summeRbund и NOISeq.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Сборка и аннотация транскриптомов

Предварительно была произведена оценка качества секвенирования с помощью программного обеспечения FastQC. От адаптерных последовательностей прочтения очищались с помощью пайплайна, написанного на языке bash в лаборатории лесной геномики СФУ. Пайплайн использует 6 инструментов, в том числе, Trimmomatic – многопоточный инструмент командной строки, который можно использовать для обрезки данных низкого качества геномной платформы Illumina (FASTQ), а также для удаления адаптеров. После фильтрации данные вновь проверялись при помощи программы FastQC. Результаты предварительной обработки данных секвенирования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Статистика по ридам после очистки от адаптеров и некачественных ридов слабопатогенного (Н-1) и сильнопатогенного (Н-2) штаммов *H. annosum*

Риды	Н-1		Н-2	
	до обработки	после обработки	до обработки	после обработки
Длина последовательностей, н.о (для одноконцевых прочтений).	35-76	40-60	35-76	40-60
GC-состав, %	55	55	54	54
Всего последовательностей	15 829 710	14 361 764	20 214 250	18 330 998
% последовательностей, прошедших отбор по качеству	90,72		90,68	

Изъято 12 страниц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования впервые были получены 2 транскриптомные сборки сибирских штаммов грибов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. с различным уровнем фитопатогенности. Наиболее длинные транскрипты были получены ассемблером Trinity, наиболее короткие — при помощи CLC. Сборки транскриптомов RNASpades содержали наибольшее количество транскриптов.

Было проанализировано 20.9 и 13.7 тысяч транскриптов 2 образцов *Heterobasidion*, для каждого из которых было найдено соответствие в базах данных, содержащих информацию о консервативных доменах и повторах. Для 37.7% и 39.3% транскриптов с помощью CLCbio и BLAST2GO программ были определены генные онтологии и преобладающие классы ферментов.

Предварительный анализ дифференциальной экспрессии позволил выявить 146 генов, экспрессия которых различается между слабопатогенным и сильнопатогенными штаммами.

В дальнейшем планируется проведение анализа генной онтологии (*ontology enrichment analysis*) для связи дифференциально экспрессируемых генов с повышенным присутствием («обогащённостью») с генами определённых семейств, возможно связанных с патогенностью.

Список используемой литературы

- 1 Asiegbu F. O., Adomas A., Stenlid J. A. N. Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. sl //Molecular plant pathology. – 2005. – Т. 6. – №. 4. – С. 395-409.
- 2 La Porta N. et al. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe //Canadian Journal of Plant Pathology. – 2008. – Т. 30. – №. 2. – С. 177-195.
- 3 Brunette M., Caurla S. An economic comparison of risk handling measures against *Hylobius abietis* and *Heterobasidion annosum* in the Landes de Gascogne Forest //Annals of Forest Science. – 2016. – Т. 73. – №. 3. – С. 777-787.
- 4 Puddu A. et al. Environmental factors related to damage by *Heterobasidion abietinum* in *Abies alba* forests in Southern Italy //Forest ecology and management. – 2003. – Т. 180. – №. 1-3. – С. 37-44.
- 5 Hansson D. et al. Sesquiterpenes from the conifer root rot pathogen *Heterobasidion occidentale* //Phytochemistry. – 2012. – Т. 82. – С. 158-165.
- 6 González-Ramírez M. et al. A natural benzofuran from the patagonic aleurodiscus vitellinus fungus has potent neuroprotective properties on a cellular model of amyloid- β peptide toxicity //Journal of Alzheimer's Disease. – 2018. – Т. 61. – №. 4. – С. 1463-1475.
- 7 Hansson D. et al. Secondary metabolite comparison of the species within the *Heterobasidion annosum* sl complex //Phytochemistry. – 2014. – Т. 108. – С. 243-251.
- 8 Murray A. C., Woodward S. In vitro interactions between bacteria isolated from *Sitka spruce* stumps and *Heterobasidion annosum* //Forest Pathology. – 2003. – Т. 33. – №. 1. – С. 53-67.
- 9 Gonthier P. et al. *Annosus* root and butt rots //Infectious forest diseases. – 2013. – С. 128-158.
- 10 Garbelotto M., Gonthier P. Biology, epidemiology, and control of

- Heterobasidion* species worldwide //Annual review of phytopathology. – 2013. – Т. 51. – С. 39-59.
- 11 Chen J. J. et al. Phylogeny, divergence time estimation, and biogeography of the genus *Heterobasidion* (Basidiomycota, Russulales) //Fungal Diversity. – 2015. – Т. 71. – №. 1. – С. 185-200.
 - 12 Павлов И. Н., Петрова Е. В. Хвойные бореальной зоны. – 2003.
 - 13 Арефьев С. П. и др. Грибные сообщества лесных экосистем. – 2012.
 - 14 Chen J. J. et al. Phylogeny, divergence time estimation, and biogeography of the genus *Heterobasidion* (Basidiomycota, Russulales) //Fungal Diversity. – 2015. – Т. 71. – №. 1. – С. 185-200.
 - 15 Hu Y. et al. The conifer root rot pathogens *Heterobasidion irregulare* and *Heterobasidion occidentale* employ different strategies to infect Norway spruce //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-10.
 - 16 Vainio E. J., Hantula J. Taxonomy, biogeography and importance of *Heterobasidion* viruses //Virus research. – 2016. – Т. 219. – С. 2-10.
 - 17 Olson Å., Stenlid J. Mitochondrial control of fungal hybrid virulence //Nature. – 2001. – Т. 411. – №. 6836. – С. 438-438.
 - 18 Kubicek C. P., Starr T. L., Glass N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi //Annual review of phytopathology. – 2014. – Т. 52. – С. 427-451.
 - 19 Keller N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery //Nature Reviews Microbiology. – 2019. – Т. 17. – №. 3. – С. 167-180.
 - 20 Faris J. D., Friesen T. L. Plant genes hijacked by necrotrophic fungal pathogens //Current Opinion in Plant Biology. – 2020. – Т. 56. – С. 74-80.
 - 21 Ciuffetti L. M., Tuori R. P., Gaventa J. M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat //The Plant Cell. – 1997. – Т. 9. – №. 2. – С. 135-144.
 - 22 Olson Å. et al. Insight into trade-off between wood decay and parasitism

- from the genome of a fungal forest pathogen //New Phytologist. – 2012. – T. 194. – №. 4. – C. 1001-1013.
- 23 Dalman K. et al. A genome-wide association study identifies genomic regions for virulence in the non-model organism *Heterobasidion annosum* ss //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 1. – C. e53525.
- 24 Van der Nest M. A. et al. Gene expression associated with intersterility in *Heterobasidion* //Fungal Genetics and Biology. – 2014. – T. 73. – C. 104-119.
- 25 Lunden K. et al. Transcriptional Responses Associated with Virulence and Defence in the Interaction between *Heterobasidion annosum* s. s. and Norway Spruce //PLoS One. – 2015. – T. 10. – №. 7. – C. e0131182.
- 26 Raffaello T. et al. Transcriptomic profiles of *Heterobasidion annosum* under abiotic stresses and during saprotrophic growth in bark, sapwood and heartwood //Environmental microbiology. – 2014. – T. 16. – №. 6. – C. 1654-1667.
- 27 Burgess T. I. et al. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens //Global Change Biology. – 2017. – T. 23. – №. 4. – C. 1661-1674.
- 28 Otrosina W. J., Garbelotto M. *Heterobasidion occidentale* sp. nov. and *Heterobasidion irregulare* nom. nov.: a disposition of North American *Heterobasidion* biological species //Fungal Biology. – 2010. – T. 114. – №. 1. – C. 16-25.
- 29 Luck J. et al. Climate change and diseases of food crops //Plant Pathology. – 2011. – T. 60. – №. 1. – C. 113-121.
- 30 Gottwald T. R., Graham J. H., Schubert T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact //Plant Health Progress. – 2002. – T. 3. – №. 1. – C. 15.
- 31 Drenkhan R. et al. Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: a comprehensive review //Forest Pathology. – 2016. – T. 46. – №. 5. – C. 408-442.

- 32 Morley N. J., Lewis J. W. Extreme climatic events and host–pathogen interactions: The impact of the 1976 drought in the UK //Ecological complexity. – 2014. – T. 17. – C. 1-19.
- 33 Anyamba A. et al. Recent weather extremes and impacts on agricultural production and vector-borne disease outbreak patterns //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 3. – C. e92538.
- 34 Luck J. et al. Climate change and diseases of food crops //Plant Pathology. – 2011. – T. 60. – №. 1. – C. 113-121.
- 35 Das T. et al. Climate change impacts on plant diseases //SAARC Journal of Agriculture. – 2016. – T. 14. – №. 2. – C. 200-209.
- 36 Vainio E. J. et al. Population structure of a novel putative mycovirus infecting the conifer root-rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato //Virology. – 2012. – T. 422. – №. 2. – C. 366-376.
- 37 Deflorio G. et al. Gene expression profiles, phenolics and lignin of *Sitka spruce* bark and sapwood before and after wounding and inoculation with *Heterobasidion annosum* //Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2011. – T. 75. – №. 4. – C. 180-187.
- 38 Oliva J., Bendz-Hellgren M., Stenlid J. Spread of *Heterobasidion annosum* ss and *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* 15 years after stump inoculation //FEMS microbiology ecology. – 2011. – T. 75. – №. 3. – C. 414-429.
- 39 Oliva J., Bendz-Hellgren M., Stenlid J. Spread of *Heterobasidion annosum* ss and *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* 15 years after stump inoculation //FEMS microbiology ecology. – 2011. – T. 75. – №. 3. – C. 414-429.
- 40 Gunulf A., Rönnberg J., Berglund M. Comparison of colonization capacity by asexual spores of *Heterobasidion* species in *Norway spruce* wood //Forest Pathology. – 2012. – T. 42. – №. 4. – C. 338-344.
- 41 Metzker M. L. Sequencing technologies—the next generation //Nature

- reviews genetics. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 31-46.
- 42 Koepfli K. P. et al. The Genome 10K Project: a way forward //Annu. Rev. Anim. Biosci. – 2015. – T. 3. – №. 1. – C. 57-111.
- 43 Poelchau M. et al. The i5k Workspace@ NAL—enabling genomic data access, visualization and curation of arthropod genomes //Nucleic acids research. – 2015. – T. 43. – №. D1. – C. D714-D719.
- 44 Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics //Nature reviews genetics. – 2009. – T. 10. – №. 1. – C. 57-63.
- 45 Conesa A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis //Genome biology. – 2016. – T. 17. – №. 1. – C. 13.
- 46 Hrdlickova R., Toloue M., Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis //Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. e1364.
- 47 Sahraeian S. M. E. et al. Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis //Nature communications. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. 1-15.
- 48 Haas B. J., Zody M. C. Advancing RNA-seq analysis //Nature biotechnology. – 2010. – T. 28. – №. 5. – C. 421-423.
- 49 Hölzer M., Marz M. De novo transcriptome assembly: A comprehensive cross-species comparison of short-read RNA-Seq assemblers //Gigascience. – 2019. – T. 8. – №. 5. – C. giz039.
- 50 Robertson G. et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data //Nature methods. – 2010. – T. 7. – №. 11. – C. 909-912.
- 51 Baker M. De novo genome assembly: what every biologist should know //Nature methods. – 2012. – T. 9. – №. 4. – C. 333-337.
- 52 Schulz M. H. et al. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels //Bioinformatics. – 2012. – T. 28. – №. 8. – C. 1086-1092.

- 53 Bankevich A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing //Journal of computational biology. – 2012. – Т. 19. – №. 5. – С. 455-477.
- 54 Grabherr M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome //Nature biotechnology. – 2011. – Т. 29. – №. 7. – С. 644-652.
- 55 Conesa A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis //Genome biology. – 2016. – Т. 17. – №. 1. – С. 13.
- 56 Napierala M. A. What is the Bonferroni correction //AAOS Now. – 2012. – Т. 6. – №. 4. – С. 40.
- 57 Ashburner M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology //Nature genetics. – 2000. – Т. 25. – №. 1. – С. 25-29.
- 58 Schulze-Kremer S. Adding semantics to genome databases: Towards an ontology for molecular biology //Ismb. – 1997. – Т. 5. – С. 272-275.
- 59 Билай В. И., Элланская И. А. Основные микологические методы в фитопатологии. Методы экспериментальной микологии //Киев: Наукова думка. – 1982.
- 60 Antipova T. V. et al. Secondary Metabolites of the Siberian Strains *Heterobasidion annosum* sensu lato //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – Т. 56. – С. 185-193.
- 61 Литовка, Ю. А., and И. Н. Павлов. "Фитопатогенность и морфолого-культуральные особенности грибов *Heterobasidion annosum* sl., выделенные из очагов массового усыхания хвойных лесов сиббири».
- 62 Grabherr M. G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data //Nature biotechnology. – 2011. – Т. 29. – №. 7. – С. 644.
- 63 Bushmanova E. et al. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data //GigaScience. – 2019. – Т. 8. – №. 9. – С. giz100.

64 Bankevich A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing //Journal of computational biology. – 2012. – T. 19. – №. 5. – C. 455-477.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 И. Е. Ямских

« 2 » 07 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Сравнительная транскриптомика сибирских штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. с различным уровнем фитопатогенности»

04.06.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика


Научный руководитель


подпись, дата

проф., к. б. н.
должность, ученая
степень


Крутовский К.В.
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Аксенова А.И.
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

с.н.с, д. б. н.
должность, ученая
степень

Литовка Ю.А.
инициалы, фамилия

Красноярск 2020