

Минобрнауки России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

На правах рукописи

Корженевский Максим Анатольевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

по результатам научно-квалификационной работы (диссертации)

на тему: **УЧАСТИЕ ТРАНСЦЕПТОРОВ САХАРОВ В РЕГУЛЯЦИИ
КСИЛОГЕНЕЗА НА ПРИМЕРЕ ДВУХ ФОРМ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ**

подготовленной в соответствии с требованиями

Федерального государственного образовательного стандарта
высшего образования по направлению 06.06.01. Биологические науки
(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

Научный руководитель:

г.н.с. лаб. физиологии и цитологии древесных растений

ИЛ КарНЦ РАН,

д.б.н, Галибина Н.А.

Петрозаводск, 2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

В 2024 г. объём заготовки круглого леса в России составил почти 200 млн м³, что формирует основу сырьевой базы для лесопромышленного комплекса и обеспечивает стабильную работу деревообрабатывающих предприятий по всей стране. Лесная отрасль обеспечивает работой более 1 млн человек в прямом и смежном производстве: от лесозаготовки до глубокой переработки древесины, поддерживая малые и средние предприятия в отдалённых регионах. В производственных цепочках деревообрабатывающей промышленности задействованы логистические компании, энергогенерирующие предприятия и сектор строительства, что создаёт мультипликативный эффект для всего регионального рынка труда. Переработка этого объёма сырья в пиломатериалы, фанеру, целлюлозу и бумагу создаёт крупный сектор добавленной стоимости, включая производство строительных лесоматериалов и мебельной продукции. В последние годы объём частных и государственных инвестиций в лесопромышленный комплекс вырос более чем на 15%, что направлено на обновление парка лесозаготовительной техники, автоматизацию пилорам и создание современных целлюлозно-бумажных производств. Федеральная целевая программа «Развитие лесного комплекса до 2030 г.» предусматривает более 200 млрд рублей инвестиций в инфраструктуру лесовосстановления, цифровизацию учёта лесных ресурсов и строительство новых деревообрабатывающих кластеров. Таким образом, несмотря на долю около 1 % в общем ВВП, лесной комплекс России играет критически важную роль в обеспечении занятости регионов, экспортном потенциале и мультисекторном развитии экономики.

Лесные экосистемы играют ключевую роль в сохранении устойчивости климата и биоразнообразия. По оценкам Минприроды РФ, один гектар зрелого леса способен ежегодно поглощать до 4–6 т CO₂, что суммарно даёт около 1 млрд т углерода в год на территории РФ. Помимо углеродной секвестрации, леса обеспечивают: регулирование водного баланса за счёт испарения и фильтрации осадков, что снижает риск паводков и засух; предотвращение эрозии почв благодаря корневой системе, укрепляющей грунт на склонах и берегах водоёмов; поддержание биоразнообразия; очистку атмосферного воздуха от твёрдых частиц и вредных газов через захват и осаждение загрязнителей на листьях. Экосистемные услуги лесов по восстановлению и хранению экосистемных функций оцениваются в миллиарды рублей ежегодно. Только углеродная секвестрация лесов РФ варьируется в эквиваленте 500–1500 млн тонн CO₂ в год, что даёт до 4,5 трлн руб. потенциальной стоимости.

Таким образом, леса России одновременно несут значительную экономическую нагрузку через выпуск и экспорт продукции и предоставляют критически важные экологические услуги. Координация углеродного обмена, водорегуляция и формирование древесины зависят от

механизмов образования вторичной ксилемы, которые в свою очередь основываются на метаболизме углеводов. Следовательно, изучение углеводного метаболизма древесных растений представляет собой не только фундаментальное направление фитофизиологии, но и экономически обоснованную стратегию повышения эффективности лесного комплекса и устойчивого управления лесными ресурсами. Одну из ключевых ролей в метаболизме углеводов играют транспортеры сахаров (SUT/SUC, MST, SWEET), регулирующие распределение углеводных потоков между фотосинтезирующими листьями и формирующейся ксилемой. Однако их функции и регуляция в условиях вторичного роста у деревьев описаны лишь фрагментарно.

Молекулярные и генетические механизмы ксилогенеза у древесных видов остаются недостаточно изученными по ряду причин: длительность процессов формирования вторичной ксилемы, сложная анатомическая структура и химический состав древесных тканей, ограниченность геномных ресурсов. Ввиду сложности изучения физиологии древесных видов зачастую предлагается экстраполяция механизмов ксилогенеза, полученных на травянистых моделях. Это приводит к серьезным искажениям, поскольку, травянистые и древесные растения имеют ряд отличий. Прежде всего, травянистые растения анатомически представляют собой первичный стебель, в то время как древесные растения – вторичный стебель. У травянистых растений во время роста функционирует пучковый камбий, а у древесных растений на протяжении всей жизни функционирует вторичный камбий, и именно он обеспечивает процесс ксилогенеза. Хотя транскрипционная и гормональная регуляция камбия у травянистых и древесных растений опирается на одни и те же элементы, сложность системы регуляции у древесных растений значительно выше. Различается как анатомия, так и биохимия ксилемы. Механизм загрузки флоэмы так же различен. Таким образом, регулирование камбия принципиально схоже по основным элементам, но у древесных растений носит более сложный, многокомпонентный и длительно действующий характер, нежели у травянистых видов. Следовательно, перенос выводов о транспорте сахаров и механизмах ксилогенеза из травянистых моделей на древесные виды не учитывает уникальные анатомо-физиологические особенности деревьев и может привести к неэффективным биотехнологическим стратегиям.

Изучение физиологии древесных растений, в том числе механизмов ксилогенеза, традиционно осложнено длительным жизненным циклом деревьев, необходимостью многолетних наблюдений и экспериментальных серий, а также сложностью и объёмом их геномов, что требует значительных вычислительных ресурсов для секвенирования и аннотации.

Уникальным и перспективным модельным объектом для изучения ксилогенеза может стать береза повислая. (1) Береза повислая (*Betula pendula* var. *pendula*) – одна из основных

лесообразующих пород, для ее древесины характерен большой спектр разнообразных структурных элементов: сосуды, волокнистые трахеиды, волокнистые элементы, приближенные по структуре к волокнам либриформа, и клетки паренхимы. Форма березы повислой – карельская береза (*B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) формирует уникальную (узорчатую) древесину. (2) В пределах одного генотипа карельской берёзы наблюдается широкий спектр фенотипических проявлений: от практически безузорчатых до ярко выраженных аномальных зон древесины, а также разнообразие форм роста (высокоствольные, короткоствольные, кустовидные). Это даёт уникальную возможность сравнивать молекулярные и биохимические механизмы ксилогенеза при минимальных различиях в генетическом фоне, что особенно ценно для выявления ключевых регуляторных звеньев и транспортеров сахаров. (3) В результате многолетних исследований коллективом Института леса КарНЦ РАН выявлены физиолого-биохимические и молекулярно-генетические закономерности, связанные со структурными особенностями и декоративными качествами древесины, предложены метаболические схемы, соответствующие различным моделям развития ксилемы. Таким образом, карельская береза – это не только объект с уникальным фенотипическим разнообразием, но и эффективная модель для изучения регуляции ксилогенеза, транспорта и метаболизма углеводов, а также для поиска генетических мишеней, перспективных для генной модификации и повышения продуктивности древесных растений.

ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучение роли транспортеров углеводов (SUT, MST, SWEET) в формировании тканей ксилемы.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Провести поиск и идентификацию углеводных транспортеров в опубликованном геноме *Betula pendula* Roth var. *pendula*.
- Исследовать экспрессию генов углеводных транспортеров в развивающихся тканях ствола у двух форм березы повислой (*B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*), различающихся по структуре древесины.
- Изучить экспрессию генов углеводных транспортеров в тканях ствола безузорчатых растений карельской березы на разных этапах камбиального роста.
- Сравнить паттерны экспрессии генов углеводных транспортеров в тканях ствола у безузорчатых растений карельской березы с узорчатыми короткоствольных и кустообразными растениями карельской березы.
- Выявить связь активности углеводных транспортеров в тканях ствола с биохимическими маркерами разных сценариев ксилогенеза.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Впервые для березы повислой проведена идентификация генов углеводных транспортеров семейств *SUT*, *MST*, *SWEET*. Впервые выявлены отличия в экспрессии генов углеводных транспортеров при формировании узорчатой (аномальной по строению) древесины карельской березы. Впервые для узорчатых короткоствольных и кустообразных растений карельской березы и безузорчатых растений карельской березы проведен сравнительный транскриптомный анализ тканей флоэмы и ксилемы на разных этапах камбиального роста: начало ксилогенеза → интенсивные деления в сторону ксилемы → активное формирование ксилемы. Впервые продемонстрирована роль транспортеров сахаров в поддержании аттрагирующей способности тканей ствола в период камбиального роста.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ. Результаты, полученные в рамках настоящего исследования, позволят расширить уже существующие знания о роли углеводных транспортеров в ксилогенезе древесных растений. Кроме того, полученные результаты могут иметь значение не только в качестве фундаментальных знаний для понимания молекулярно-генетических особенностей механизмов транспорта углеводов в тканях ствола и формировании структурных элементов, но и для управления процессами роста растения и формирования вторичной клеточной стенки. Результаты работы могут быть реализованы в области биотехнологий, генной инженерии, лесной промышленности.

Исследование было выполнено на базе лаборатории физиологии и цитологии древесных растений и с использованием оборудования ЦКП ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Сведения об обзоре литературы

В главе «Обзор литературы» представлены доступные на данный момент в литературе сведения об особенностях ксилогенеза древесных растений. Обобщены современные представления о молекулярной регуляции ксилогенеза (системы WOX-PXY-CLE, роль ауксинового сигналинга, MYB-факторы и киназные системы (SnRK1, TOR, MAP). Рассмотрена роль углеводного метаболизма в контексте ксилогенеза: транспортные системы и ферменты метаболизации углеводов. Обобщены известные данные о кладах и подсемействах трех групп углеводных транспортеров (SUT -сахарозные экспортеры, MST - гексозные экспортеры, SWEET – углеводные импортеры). Приведены примеры различий в ксилогенезе у древесных и травянистых растений, обоснованы проблемы экстраполяции данных, полученных на травянистых растениях на древесные растения. Обобщены литературные сведения о карельской березе.

Аналогичных работ по обширному исследованию роли углеводных транспортеров в регуляции работы камбия *Betula pendula* Roth var. *pendula*, *B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti ранее не проводилось.

2. Материалы и методы

Объектами исследования являются две формы березы повислой, произрастающие в натуральных условиях: березы повислой с типичной для вида прямослойной древесиной *B. pendula* var. *pendula* (далее обычная береза повислая) и карельская береза *B. pendula* var. *carelica* с узорчатой и безузорчатой древесиной ствола. Объекты разделили на две группы:

Первая группа (16-летние растения березы повислой). Растения выращены из семян одной партии. Семена карельской березы получены от контролируемого опыления родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Все растения произрастают в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН. Было выбрано пять деревьев обычной березы и четыре дерева карельской березы. Для отбора растительного материала со стволов карельской березы выбирали участки ствола с наибольшей степенью проявления структурных аномалий. Отбор материала производили в период камбиального роста 12 июля 2022 года (период активного утолщения вторичной клеточной стенки волокон). Для биохимических и молекулярно-генетических исследований отделяли кору от древесины. С внутренней поверхности коры препарировали комплексы тканей (далее – фракция 1 (F1)), включающие несколько слоев дифференцирующейся ксилемы, камбиальную зону, дифференцирующуюся флоэму и зрелую флоэму текущего года. С

наружной поверхности древесины препарировали комплекс тканей, включающий дифференцирующуюся ксилему (фракция 2 (F2)).

Вторая группа (36-летние растения карельской березы). Семена карельской березы получены от контролируемого опыления родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Все растения произрастают в одинаковых почвенно-климатических условиях на Заонежской ЛСП, Медвежьегорский район. Среди деревьев карельской березы подобраны безузорчатые деревья и узорчатые деревья короткоствольной и кустообразной формы. Отбор материала производили в течение периода камбиального роста 2023 года: (1) начало ксилогенеза (24.05.2023); (2) активное формирование ксилемы (09.06.2023); (3) период дифференциации сосудов (27.06.2023). В каждую дату отбора с безузорчатых (4 шт.) деревьев карельской березы и узорчатых деревьев короткоствольной (3 шт.) и кустообразной (3 шт.) формы отбирали ткани фракций 1 и 2.

Отбор тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Для биохимических и молекулярно-генетических исследований растительный материал подвергали шоковой заморозке жидким азотом и хранили при -80°C до последующего анализа.

2.1.Анатомические исследования

Отобранные образцы коры и древесины фиксировали раствором глутаральдегида, затем последовательно обезживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в смеси Аралдита и Эпона-812 по классической методике. Поперечные срезы площадью 7–10 мм² и толщиной 2 мкм изготавливали на ультротоме и окрашивали 1% водным раствором сафранина. Исследования проводили на световом микроскопе. Соотношение различных типов клеток в формирующихся тканях определяли с помощью метода сетки, анализируя не менее 500 точек на образец.

2.2.Биохимические исследования

Для определения активности ферментов навеску растительной ткани растирали с жидким азотом и буфером для экстракции. После экстракции гомогенат центрифугировали. Супернатант очищали на колонках. Далее собирали аликвоты, содержащие наибольшее количество белка фермента. В тканях концентрация белка составляла 10-50 мкг/мл. Содержание белка определяли по методу Бредфорда.

Инкубация для определения активности апопластной инвертазы (АпИньв) проводилась при 30°C в течение 30 минут. Образовавшуюся глюкозу определяли глюкозооксидазным методом, количество ее выражали в мкмоль глюкозы на 1 г ткани за 30 мин. Инкубация для

определения активности СС проводилась при 37°C в течение 60 минут. Образовавшуюся фруктозу определяли в реакции с 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым по увеличению оптической плотности при $\lambda = 495$ нм, количество ее выражали в мкмоль фруктозы на 1 мг белка за 30 мин.

2.3. Биоинформатические исследования

Гены углеводных транспортеров *Betula pendula* были выявлены с помощью BLAST-поиска по опубликованному геному *B. pendula* var. *pendula*; v1.2 scaffolds на портале Genomevolution. Сходство и идентичность последовательностей с известными последовательностями оценивали попарным выравниванием средствами EMBOSS Needle.

Филогенетический анализ проводили в MEGA 11.0, на основании кластеризации с белками *A. thaliana*, *V. vinifera* и *P. Trichocarpa* методом Maximum Likelihood). Для выравнивания использовали MUSCLE в стандартных параметрах; пробелы (gaps) удаляли.

Консервативные домены искали с помощью NCBI Batch CD-Search. Топологию трансмембранных сегментов прогнозировали программой DeepTMHMM 1.0.24. Обнаружение мотивов белков выполняли в MEME v.5.5.5. Поиск цис- элементов в промоторных участках (2 кб) осуществляли через PlantPAN 3.0 TF/TFBS Search. Локализацию генов на хромосомах определяли через браузер генома.

2.4. Выделение и очистка суммарной РНК, синтез кДНК

Выделение тотальной РНК из тканей ствола производили с использованием CTAB и SDS. Дополнительно полученный препарат обрабатывали ДНКазой и ингибиторами РНКаз. ОТ выполнялась в термоциклере с набором реагентов MMLVRT.

Концентрацию кДНК оценивали спектрофотометрически по максимуму поглощения на длине волны 260 нм. Качество полученного препарата определяли по соотношению длин волн (A260/A280 и A260/A230).

2.5. Алгоритм сборки транскриптов

Контроль качества данных RNA-seq осуществлялся FastQC v0.11.9 с агрегацией результатов MultiQC v1.12. Предварительная обработка включала фильтрацию данных BBduk (BBMap v39.06) с удалением адаптеров и коротких ридов (<50 п.н.). Выравнивание на референсный геном *Betula pendula* (scaffold assembly v1.2, CoGe) проводилось HISAT2 v2.2.1 с использованием аннотации GFF. Результаты картирования обрабатывались SAMtools v1.16.1 для получения стандартных форматов SAM/BAM. Сборка транскриптов и количественная

оценка экспрессии выполнялась StringTie v2.2.1 на основе отсортированных BAM-файлов с получением данных о числе прочтений (TGR)..

2.6. Статистическая обработка данных

Нормализация данных и анализ дифференциальной экспрессии проводились с использованием пакета DESeq2 v1.44.0, применяющего статистическую модель на основе отрицательного биномиального распределения для учета биологической и технической вариабельности данных. Нормализация выполнялась методом median ratio для устойчивости к выбросам и учета различий в глубине секвенирования между образцами. Дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) считались гены, удовлетворяющие критериям SEQC/MAQC-III: $|\log_2FC| \geq 2$, $TGR \geq 16$, $padj \leq 0.01$ (коррекция Бенджамини-Хохберга). Статистическая обработка результатов выполнялась в PAST v4.0 с проверкой нормальности распределения (тест Шапиро-Уилка) и оценкой значимости различий (критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$). Анализ главных компонент и визуализация данных проводились в R с использованием пакетов DESeq2 и ggplot2.

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Биоинформатические исследования

В геноме березы мы нашли все известные группы генов переносчиков сахаров – SUT (Sucrose Transporter), SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) и MST (Monosaccharide Transporter) генов.

BpSUT.

В геноме *B. pendula* было выявлено 3 гена *BpSUT* имеющие 12 трансмембранных доменов. У всех был выявлен консервативный домен GPH sucrose. Обнаруженные гены были названы согласно идентичности кодируемых ими белков ближайшим белкам *A. thaliana*, которая составила от 60,6% до 71,8%. Для филогенетическом анализа были взяты идентифицированные белки *B. pendula*, а также описанные в литературе белки *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa*. Белок BpSUT2 согласно гомологии *A. thaliana* относится к специфичной для двудольных кладе I. BpSUT3 and BpSUT4 относятся к кладе II и кладе III соответственно. Анализ экзон-интронной организации обнаруженных BpSUT показал соответствие генам модельных растений *A. thaliana*, *P. Trichocarpa* (за исключением BpSUT2). У всех белков было идентифицировано 7 консервативных мотивов.

BpSWEET

В геноме *B. pendula* было выявлено 10 генов, BpSWEET в. У всех выявленных генов предсказано 7 трансмембранных доменов, обнаружено 2 функциональных MtN3 домена (кроме BpSWEET11: 13 и 4 домена соответственно) Идентичность найденных белков ближайшим белкам *A. thaliana* составила от 27,3% (BpSWEET17c) до 68,2% (BpSWEET2). Белки BpSWEET, согласно филогенетическому анализу, разделяются на 4 клады, соответствующие 4 типам белков. Согласно гомологии *A. thaliana* в кладу I входят BpSWEET1, 2, 3, в кладу II – BpSWEET4, 7 в кладу III – BpSWEET9, 11, в кладу IV вошли белки SWEET17a, b, c. Анализ экзон-интронной организации обнаруженных BpSWEET показал соответствие генам *A. thaliana*. Анализ консервативных мотивов выявил типичную для семейства 3+1+3 структуру (за исключением BpSWEET11 со структурой 3+1+3...3+1+3

BpMST

В геноме *B. pendula* было выявлено 36 генов, MST. Из них 14 гомологичны генам STP/HT (Sugar Transport Protein / Hexose Transporter), 5 EDR-6like (Early Dehydration-Responsive 6-like), 8 PMT (Polyol/Monosaccharide Transporter), 3 INT (Inositol Transporter), 1 TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter), 2 VGT (Vacuolar Glucose Transporter) и 3 pGlucT/SBG1 (Plastidic Glucose Transporter / Sugar Beet Glc Transporter 1). Идентичность найденных белков ближайшим белкам *A. thaliana* составила от 24.7% (BpSTP16) до 81.9% (BpERD-6like5). При анализе белков семейства BpMST было сосредоточено внимание на выявлении 12 консервативных мотивов. Мотивы 1, 3, 5, 6, 8, 9 встречаются у всех BpMST, У всех обнаруженных BpMST обнаружен консервативный MFS-домен и по 12 трансмембранных доменов. Экзон-интронная организация BpMST в целом соответствует AtMST.

Выявлено, что гены транспортёров сахара представлены на всех хромосомах, за исключением VIII. На хромосомах I, V, VII и X выявлены кластеры различных транспортёров, что может указывать на общую биологическую функцию. Многие близкородственные гены расположены очень близко друг к другу: BpSTP13a и BpSTP13b, BpPMT5a и BpPMT5b, BpSWEET17a, BpSWEET17b и BpSWEET17c, BpPMT7a и BpPMT7b.

3.2. Дифференциальная экспрессия генов углеводных транспортеров между

B. pendula var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*

В рамках исследования экспрессии целевых генов выполнена сборка собственного транскриптома на основе тканей ствола 16-летних растений обычной березы и карельской березы, полученных путём контролируемого опыления. Образцы отбирались 12 июня 2022 года на Агробιοлогической станции КарНЦ РАН. В этот период камбиального роста происходит

утолщение и лигнификация вторичных клеточных стенок клеток ксилемы. Для RNA-Seq анализа использовались фракцию F1, включающую несколько слоев дифференцирующейся ксилемы, камбиальную зону, дифференцирующуюся флоэму и зрелую флоэму текущего года.

Для выявления ключевых генов интереса выполнены анализ дифференциальной экспрессии и PCA матрицы TGR. В качестве дополнительной группы в PCA включены гены ферментов метаболизма сахарозы: сахарозосинтаза и инвертаза. Из первоначального списка из 59 генов интереса (49 транспортёров углеводов и 10 генов сахарозосинтаз, инвертаз и их ингибиторов) исключены 25 генов со средней экспрессией ниже 50 TGR. Оставшиеся 36 генов с достаточно высоким уровнем экспрессии были взяты для PCA.

При PCA анализе, первая компонента (PC 1 = 43,2%) разделяет образцы по формам березы. Наиболее значимыми генами для первой компоненты являются *BpSWEET7*, *BpPMT5a*, *5b* и *BpINT2*. Все эти гены имеют выраженную ($\text{Log}_2 > 2,36$), статистически достоверную ($\text{padj} < 0,01$) дифференциальную экспрессию. Во всех случаях повышенная экспрессия наблюдается у карельской березы. Особенно заметна разница у генов семейства PMT – у обычной березы экспрессия низкая ($\text{TGR} < 100$), в то время как у карельской березы она достигает значительно больших значений (ср. знач. TGR 400 и 960). Вторая компонента (PC 2 = 20,8%) не разделяет образцы по каким-либо характерным признакам, и скорее описывает индивидуальные различия. Наиболее значимыми генами второй компоненты являются *BpPMT7b* и *BpSUS4*. Однако достоверной дифференциальной экспрессии для этих генов не наблюдается.

Среди генов с достоверной ($\text{padj} < 0,01$) дифференциальной экспрессией, не выявленных PCA, можно отметить *BpSWEET17a*, *BpINT1* и *BpERD-6like2*. Так же достоин упоминания ген инвертазы клеточной стенки *BpCWIN1* ($\text{Log}_2 = 1,7$) хоть он и обладает меньшей достоверностью ($\text{padj} < 0,012$), изменение активности инвертаз у растений карельской березы давно известно из предыдущих работ коллектива ИЛ КарНЦ РАН.

3.3. Дифференциальная экспрессия генов углеводных транспортеров между растениями карельской березы

В рамках исследования экспрессии целевых генов выполнена сборка собственного транскриптома на основе тканей ствола 36-летних растений карельской березы.

Для PCA анализа были отобраны 36 генов интереса, обладающие значимой экспрессией, а также оценена их дифференциальная экспрессия по фракциям, датам и формам роста. По

результатам PCA всех образцов, первая компонента (PC 1 = 65%) разделяет образцы по фракциям ткани. Наиболее значимыми генами для первой компоненты являются гены *BpSWEET1*, 3, 7, *BpSUS5*, 6. Все эти гены можно назвать специфичными для флоэмы, поскольку они обладают средней и высокой экспрессией в первой фракции и незначительной экспрессией во второй фракции ($\text{Log}_2 F1/F2 > 4,75$). При этом среди генов интереса не было выявлено характерных для дифференцирующейся ксилемы. Вторая компонента разделяет образцы по разным формам карельской березы (PC 2 = 12%), в ней выделяются гены *BpSWEET3*, *BpPMT5a* и *BpCWIN1*.

PCA всех образцов первой фракции разделил образцы как по формам роста, так и по дате отбора. Первая компонента (PC 1 = 31,3%) характеризует формы роста, наиболее значимыми генами оказались *BpSWEET3*, 7, *BpPMT5a*, *BpCWIN1*. Повышенная экспрессия *BpSWEET3* характерна для безузорчатых форм, остальные выявленные гены имеют повышенную экспрессию у узорчатых растений. Вторая компонента (PC 2 = 21,1%) характеризует время отбора образцов. В ней наиболее важными генами являются *BpSWEET3*, 7, 17a, *BpPMT5a*, *BpERD-6like2*. В этом случае, в ходе вегетационного периода наблюдается увеличение экспрессии всех перечисленных генов кроме *BpSWEET7*, его экспрессия снижается во времени.

При анализе всех образцов второй фракции дополнительно исключили гены, имеющие низкую экспрессию во этой фракции (*BpSWEET1*, 3, 7, *BpSUS5*, 6). В результате PCA второй фракции первая компонента (PC 1 = 50,1%) разделила образцы по формам роста. Наиболее значимые гены *BpPMT5a* и *BpCWIN1*. Повышенная экспрессия обоих выявленных генов характерна для узорчатых растений. Вторая компонента (PC 2 = 12,5%) скорее разделяет образцы по индивидуальным отличиям, чем по времени или форме роста. Тем не менее, во второй компоненте большую роль играют в том числе гены *BpSWEET17a* и *BpCWIN1* обладающие статистически значимой дифференциальной экспрессией и выявленные в других PCA анализах.

Все гены, выявленные PCA анализом как наиболее значимые, так же обладают достоверной дифференциальной экспрессией ($\text{Log}_2 > 1,3$, $\text{padj} < 0,01$). Итого, наиболее значимыми дифференциально экспрессируемыми генами являются *BpSWEET3*, 7, 17a, *BpPMT5a* и *BpCWIN1*. Так же обращают на себя внимание *BpCVIF* (ингибитор апопластной инвертазы) не выявленный PCA, но обладающий статистически значимой дифференциальной экспрессией во времени и между растениями с разными формами роста.

Экспрессия генов семейства *SWEET* обнаруживается лишь в первой фракции, Исключением является ген *BpSWEET17a*, его экспрессия обнаруживается в обеих фракциях и

имеет сложный характер. В первой фракции в первую дату отбора *BpSWEET17a* имеет достоверно дифференциальную экспрессию у кустообразных форм относительно безузорчатых и короткоствольных. Во вторую дату отбора дифференциальной экспрессии между формами не наблюдается. В третью дату отбора вновь наблюдается дифференциальная экспрессия между кустообразными и безузорчатыми растениями, при этом узорчатые короткоствольные не отличаются ни от безузорчатых, ни от кустообразных. При всем этом, у безузорчатых растений наблюдается устойчивое статистически достоверное увеличение экспрессии этого гена во времени. А у кустообразных форм изменение дифференциальной экспрессии во времени не имеет устойчивого характера. Во второй фракции *BpSWEET17a* не имеет статистически достоверной дифференциальной экспрессии ни во времени, ни между различными формами роста.

Специфичные для первой фракции гены семейства *SWEET* характеризуются дифференциальной экспрессией во времени. Например, *BpSWEET1* у безузорчатых растений демонстрирует статистически достоверное увеличение экспрессии к третьей дате отбора (27.06.2023, период дифференциации сосудов), при этом, у узорчатых растений увеличения экспрессии не происходит. Похожим образом ведет себя *BpSWEET3*, однако его экспрессия к третьей дате отбора достигает значительно больших величин, так же наблюдается статистически достоверное увеличение экспрессии и у короткоствольных узорчатых форм. Дифференциальная экспрессия *BpSWEET7* не имеет статистической значимости (наименьший $\text{padj} = 0,09$), однако PCA анализ, проведенный для всех образцов первой фракции, показывает, что этот ген имеет высокую корреляцию как с датами отбора, так и с формами роста. Поэтому мы считаем допустимым обсуждение изменения его экспрессии. У гена *BpSWEET7* отмечается высокая экспрессия в первую дату отбора (24.05.2023, начало ксилогенеза), которая снижается во вторую дату отбора (9.06.2023) и еще сильнее снижается в третью дату отбора (27.06.2023). При этом, экспрессия этого гена у узорчатых форм в среднем выше, чем у безузорчатых. Характерной особенностью является статистически достоверная дифференциальная экспрессия этого гена между короткоствольной и кустообразной формами узорчатых растений карельской березы во вторую дату отбора (09.06.2023, активное формирование ксилемы).

BpPMT5a имеет достаточно низкую среднюю экспрессию по образцам, однако имеет яркую дифференциальную экспрессию как во времени, так и между растениями с различными формами роста. Прежде всего стоит сказать, что экспрессия этого гена в группах имеет не постоянный характер, поэтому разница между средним арифметическим и медианой может быть очень высокой. Следовательно выводы о роли этого гена стоит делать с большой осторожностью. Тем не менее, статистически достоверная дифференциальная экспрессия и

высокая корреляция в PCA не позволяет игнорировать этот ген. Прежде всего стоит отметить, что у безузорчатых форм этот ген имеет незначительную экспрессию ($TDR < 30$), лишь у двух отдельных растений она достигает значений 200-300 в отдельные даты отбора. При этом у узорчатых растений TGR может достигать 2000. Во всех трех PCA анализах отмечается высокая корреляция экспрессии этого гена с признаком узорчатой древесины. Можно сказать, что этот ген имеет устойчивую экспрессию только у узорчатых растений.

Ввиду высокой значимости *BpPMT5a* в этом исследовании, мы так же обращаем внимание на *BpPMT7b*. Этот ген напротив, обладает выраженной экспрессией у всех растений, но его экспрессия у узорчатых растений снижена, относительно безузорчатых (различия статистически значимы, Log_2 в среднем 0.7). Дифференциальная экспрессия между растениями с разными формами роста статистически значима.

Среди генов ферментов углеводного метаболизма наиболее важным согласно PCA анализу является *BpCWIN1* (апопластная инвертаза). Он обладает не высокой экспрессией, но имеет высокие значения Log_2 (средний $\text{Log}_2 > 2,9$) и статистически достоверные отличия в обеих фракциях. Для этого гена характерна повышенная экспрессия у узорчатых форм. При этом связь экспрессии гена с временем отбора не прослеживается.

BpCVIF (ингибитор апопластной инвертазы) не выявляется PCA, однако он имеет достаточно высокие значения экспрессии, а также является одним из двух генов углеводного метаболизма со статистически значимой дифференциальной экспрессией между короткоствольными и кустообразными формами.

Несмотря на повышенную экспрессию этого гена ингибитора инвертаз у узорчатых форм, фактического уменьшения активности инвертаз не происходит. Напротив, как в этом исследовании, так и в предыдущих наших работах, мы наблюдаем повышенную активность инвертаз у узорчатых растений особенно во фракции 1.

Двумя другими генами ферментов углеводного метаболизма, обращающими на себя внимание являются гены, кодирующие сахарозсинтазу *BpSUS3* и *BpSUS4*. Они имеют очень высокие значения экспрессии. PCA не выявляет эти гены, как особенно значимые, однако их дифференциальная экспрессия между формами статистически достоверна. Главным образом дифференциальная экспрессия проявляется во второй фракции в первую дату отбора (24.05.2023, начало ксилогенеза), менее во вторую (09.06.2023, активное формирование ксилемы), а в третью дату отбора (27.06.2023, период дифференциации сосудов) различия в

экспрессии между формами исчезают. При этом *BpSUS3* имеет повышенную экспрессию у узорчатых форм, а *BpSUS4* пониженную.

ВЫВОДЫ

- В геноме *B. pendula* обнаружено 49 генов, кодирующих транспортеры углеводов, дана их структурная характеристика. Среди идентифицированных генов 3 относятся к семейству *SUT* (сахарозные транспортеры), 36 генов – к семейству *MST* (транспортеры моносахаров) и 10 генов принадлежат к семейству *SWEET* (транспортеры гексоз и сахарозы).
- Показано, что в тканях ствола, включающих проводящую флоэму и камбиальную зону, у растений *B. pendula* var. *carelica* в местах формирования структурных аномалий, по сравнению *B. pendula* var. *pendula*, повышена экспрессия генов углеводных транспортеров из цитозоля (*BpSWEET7*, *BpSWEET17a*) и транспортеров моносахаров в цитозоль (*BpPMT5a*, *5b*, *BpINT1*, *2*, *BpEDR-6like2*).
- Установлена пространственно-временная активность транспортеров углеводов в тканях ствола безузорчатых растений карельской березы. В начале ксилогенеза и в период активного камбиального роста повышена экспрессия представителя клады II (*BpSWEET7*), на поздних этапах камбиального роста возрастает активность представителей клады I семейства *SWEET* (*BpSWEET1,3*). Значимая экспрессия этих генов отмечена только в проводящей флоэме и камбиальной зоне.
- У узорчатых растений карельской березы пространственно-временная экспрессия генов транспортеров углеводов схожа с таковой у безузорчатых растений карельской березы. Выявлено, что в камбиальной зоне и проводящей флоэме узорчатых растений выше активность генов семейства *SWEET* (*BpSWEET1,3*, *BpSWEET7* и *BpSWEET17a*) и семейства *MST* (*BpPMT5a*, *5b* и *BpINT1,2*).
- Установлено, что формирование типичной для вида прямослойной древесины у березы повислой происходит на фоне повышения транспорта сахаров из флоэмы в камбиальную зону и дифференцирующуюся ксилему в период активного утолщения и лигнификации вторичных клеточных стенок; формирование узорчатой древесины у карельской березы происходит на фоне повышения транспорта сахаров в камбиальную зону и дифференцирующуюся ксилему на начальных этапах камбиального роста. В местах формирования аномалий у карельской березы усиливается апоплатный путь утилизации сахарозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить роль транспортеров углеводов в различных сценариях ксилогенеза у древесных растений. Объектами исследования были две формы березы повислой – обычная береза повислая (*Betula pendula* var. *pendula*), у которой формируется типичная для вида прямослойная древесина, и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica*), у которой в пределах одного дерева, наряду с формированием нормальной по строению древесины, образуется узорчатая (аномальная по структуре) древесина ствола.

В результате проведенного исследования выполнен поиск и дана структурная характеристика генов, кодирующих транспортеры углеводов у *B. pendula*. Показано, что среди идентифицированных генов три гена относятся к семейству SUT, 10 генов – к семейству SWEET и 36 генов – к семейству MST. Обнаружено, что число генов транспортеров углеводов у *B. pendula* меньше, чем у модельного травянистого растения *A. thaliana* (9 SUT, 16 SWEET и 53 MST генов), и у других древесных растений, например, у *V. vinifera* описано 4 SUT и 51 MST, а у *P. trichocarpa* – 5 SUT и 25 SWEET. Меньшее число идентифицированных генов у *B. pendula* может быть не только следствием видовых особенностей, но также качеством сборки генома *Betula pendula* v 1.2. Так, показатель N50 (длина самого короткого контига, при которой половина всего генома покрыта контигами данной длины или больше) составляет всего 527,7 Кб, в то время как у современных сборок данный показатель составляет десятки и сотни Мб.

Впервые продемонстрирована роль транспортеров сахаров в поддержании аттрагирующей способности тканей ствола в период камбиального роста. Высказано предположение, что представители клады I семейства SWEET (BpSWEET1-3) участвуют в обеспечении процессов ксилогенеза сахарами на поздних этапах камбиального роста в то время, как представители клады II (BpSWEET7) – в начале ксилогенеза и в период активного камбиального роста. Исходя из известной функции транспортеров семейства SWEET уровень экспрессии, кодирующих их генов, можно рассматривать как индикатор потока сахаров в камбиальную зону на начальных этапах ксилогенеза (BpSWEET7) и в период утолщения и лигнификации вторичной клеточной стенки (BpSWEET1-3). В результате сравнительного анализа количества транскриптов генов клады I и II семейства SWEET в камбиальной зоне растений березы повислой, отличающихся сценариями ксилогенеза, впервые получены следующие результаты. (1) Формирование типичной для вида прямослойной древесины (обычная береза, безузорчатые растения карельской березы) происходит на фоне повышения транспорта сахаров из флоэмы в камбиальную зону и дифференцирующуюся ксилему в период активного утолщения и лигнификации вторичных клеточных стенок. (2) Формирование узорчатой древесины у карельской березы происходит на фоне повышения транспорта сахаров в

камбиальную зону и дифференцирующуюся ксилему на начальных этапах камбиального роста. При этом нарушается градиент сахарозы в радиальном ряду: проводящая флоэма – камбиальная зона – дифференцирующаяся ксилема. В результате в местах формирования аномалий у карельской березы усиливается апопластный путь утилизации сахарозы, изменяется сценарий дифференциации производных камбиальных инициалей и, как следствие, усиливается паренхиматизации тканей ствола. (3) Безузорчатые растения карельской березы, на основании активности генов клады II семейства SWEET, занимают промежуточное положение между растениями обычной березы и узорчатыми растениями карельской березы.

Установлено, что у узорчатых растений карельской березы повышена экспрессия генов, кодирующих: переносчики полиолов (PMT и INT); белки подсемейства EDR-6like, локализованные на тонопласте и поддерживающих внутриклеточный гомеостаз; белки SWEET 17 локализованные на тонопласте и поддерживающие гомеостаз при стрессе, а также участвующие при лигнификации. Полученные данные могут свидетельствовать об активизации апопластного транспорта в местах формирования узорчатой древесины у карельской березы, в условиях нарушения проводимости флоэмы. Это согласуется с увеличением активности апопластной инвертазы и повышенной экспрессией кодирующих ее генов.

Таким образом, впервые получены обширные данные об экспрессии углеводных транспортеров в тканях флоэмы и дифференцирующейся ксилемы на примере взрослых древесных растений, установлена важная роль транспортеров сахаров (семейства SUT, SWEET, MST) в распределении метаболитов между развивающимися тканями ствола при нарушении сценария ксилогенеза по типу карельской березы. Понимание молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе формирования древесины, имеет решающее значение для поддержания производства древесины во все более неблагоприятных условиях окружающей среды. Полученные данные имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение для реализации программ, направленных на увеличение продуктивности древесных растений в области биотехнологии и генной инженерии.

На основании проведенного исследования предложены связи активности транспортеров углеводов с известными анатомическими и физиолого-биохимическими особенностями растений карельской березы.

Список публикаций, в которых изложены основные результаты научно-исследовательской работы

По теме исследования опубликовано 13 работ, из них 4 статьи в высокорейтинговых научных журналах, в том числе рекомендованных ВАК для публикации результатов научных исследований и 9 тезисов и материалов докладов

1. Korzhenevskiy, M.A. Genome-Wide Identification and Characterization of Sugar Transporter Genes in Silver Birch / M.A. Korzhenevskiy, Yu.L. Moshchenskaya, T.V. Tarelkina, N.A. Galibina // Russian Journal of Genetics. – Pleiades Publishing Ltd, 2024. – Vol. 60 – № 10 – P. 1319–1332 – doi:[10.1134/s1022795424700868](https://doi.org/10.1134/s1022795424700868).
2. Moshchenskaya, Y.L. Participation of *CWINV* and *SUS* Genes in Sucrose Utilization in the Disruption of Cambium Derivatives Differentiation of Silver Birch / Y.L. Moshchenskaya, N.A. Galibina, A.A. Serkova, T.V. Tarelkina, K.M. Nikerova, M.A. Korzhenevsky, I.N. Sofronova, L.I. Semenova // Protein & Peptide Letters. – Bentham Science Publishers Ltd., 2024a. – Vol. 31 – № 6 – P. 479–489 – doi:[10.2174/0109298665309207240621094227](https://doi.org/10.2174/0109298665309207240621094227).
3. Moshchenskaya, Yu.L. Disruption of Long-Distance Transport Leads to Changes in Gene Expression Profiles of Sugar Transporters in Silver Birch [Электронный ресурс] / Yu.L. Moshchenskaya, N.A. Galibina, T.V. Tarelkina, K.M. Nikerova, A.A. Serkova, M.A. Korzhenevskiy, A.V. Klimova, I.N. Sofronova, L.I. Semenova // Russian Journal of Plant Physiology. – 2024b. – Vol. 71 – № 3 – P. 72 – doi:[10.1134/S1021443724604944](https://doi.org/10.1134/S1021443724604944).
4. Nikerova, K.M. *UPBEAT1*-ROS-POD-*PAL* System under Different Xylogenesis Scenarios in Karelian Birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) / K.M. Nikerova, N.A. Galibina, I.N. Sofronova, Y.L. Moshchenskaya, M.A. Korzhenevskij, A.V. Klimova, T.V. Tarelkina // Protein & Peptide Letters. – Bentham Science Publishers Ltd., 2024. – Vol. 31 – № 5 – P. 375–385 – doi:[10.2174/0109298665291781240529044444](https://doi.org/10.2174/0109298665291781240529044444).

Перечень всероссийских и международных конференций, на которых представлены основные результаты научно-исследовательской работы

Основные результаты выпускной квалификационной работы были представлены на 9 международных и российских научных мероприятиях в виде устных и стендовых докладов:

1. “PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS AND BIOTECHNOLOGY” (PlantGen 2023) Kazan, July 10-15, 2023. **Korzhenevskiy M.**, Tarelkina T., Galibina N., Moshchenskaya Y. «*Betula pendula* Roth sugar transporters genes identification and characterization in silico».
2. X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» Уфа, 18-23 сентября 2023 г. **Корженевский М.А.**, Мощенская Ю.Л., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Горшков О.В. «Дифференциальная экспрессия семейств генов SUT, SWEET, MST в тканях ствола двух форм *Betula pendula*».
3. 8-е Международное совещание «СОХРАНЕНИЕ И РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕСНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ» Петрозаводск 2–7 сентября 2024 г. **Корженевский М.А.**, Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., Тарелкина Т.В., Никерова К.М., Серкова А.А., Софронова И.Н., Семенова Л.И. «Профили экспрессии генов транспортеров сахаров при нарушении проводимости флоэмы у березы повислой»
4. Конференция молодых ученых в составе школы молодых учёных «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PlantGen School 2024) в составе Мульти-школы молодых учёных SBB-2024 г. Новосибирск, 25-30 ноября 2024 г. **Korzhenevskiy M.A.**, Pomeranets A.K., Gorshkov O.V., Moshchenskaya Yu.L. Galibina N.A. «Sugar transporter genes' differential expression in Karelian birch (*Betula pendula* var. *carelica*) trunk tissues under different xylogenesis scenarios».
5. X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» Уфа, 18-23 сентября 2023 г.. Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., **Корженевский М.А.**, Тарелкина Т.В., Серкова А.А., Никерова К.М. «Особенности сахарозного сигналинга у карельской березы».
6. Экспериментальная биология растений и климатические вызовы» г. Екатеринбург 3–8 октября 2024 г. Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., **Корженевский М.А.**, Тарелкина Т.В., Никерова К.М., Семенова Л.И. «Участие растительных нуклеаз в формировании тканей ствола древесных растений».

7. “PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS AND BIOTECHNOLOGY” (PlantGen 2023) Kazan, July 10-15, 2023 Galibina N.A., Moshchenskaya Y.L., Tarelkina T.V., Nikerova K.M., **Korzhenevskii M.A.**, Serkova A.A., Afoshin N.V., Semenova L.I., Ivanova D.S. «Cambium stem cells functioning and their derivatives differentiation programs at different stages of woody plant ontogenesis».
8. IV Междунар. симп. и школы молодых ученых «Роль активных форм кислорода в жизни растений», Минск, 25–28 авг. 2024 г. Никерова К. М., Галибина Н. А. , Софронова И. Н., Мощенская Ю. Л., **Корженевский М. А.**, Тарелкина Т. В., Климова А. В., Коржова М. А., Макарова Т. Н., Семенова Л. И., Серкова А. А. «Система UPBEAT1-АФК-ПОД-PAL (UPBEAT1-ROS-POD-PAL) при изменении соотношения дифференцировка/пролиферация камбиальных инициалей у древесных растений на примере березы повислой *Betula pendula* var. *pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti.»
9. Экспериментальная биология растений и климатические вызовы г. Екатеринбург 3–8 октября 2024 г. Никерова К.М., Галибина Н.А., Софронова И.Н., Мощенская Ю.Л., **Корженевский М.А.**, Климова А.В., Тарелкина Т.В. «Пространственно-временные параметры отбора тканей узорчатых растений карельской березы для изучения ксилогенеза».

Список конкурсных проектов, в рамках которых выполнялись исследования

1. Государственное задание ИЛ КарНЦ РАН (2021-2025 г.г., рук. Крышень А.М., Минобрнауки России, FMEN-2021-0018) «Комплексное исследование факторов продуктивности таежных лесов» Номер госрегистрации - 121061500082-2. Номер темы – 167
2. Грант РФФ 22-74-00133 (2022–2024 г.) «Роль O₂-/H₂O₂ в регуляции дифференцировки стволовых клеток камбия при разных сценариях ксилогенеза» Руководитель – к.б.н. Никерова К.М. Роль в проекте – исполнитель.
3. Грант РФФ 22-74-00096 (2022–2024 г.) «Роль компонентов сахарозного сигналинга в определении молекулярно-генетической программы дифференцировки сосудистого камбия древесных растений» Руководитель – к.б.н. Мощенская Ю.Л. Роль в проекте – исполнитель.