

Ранний и поздний транскрипционный ответ на низкие концентрации экзогенной салициловой кислоты в корне *Arabidopsis thaliana* L.

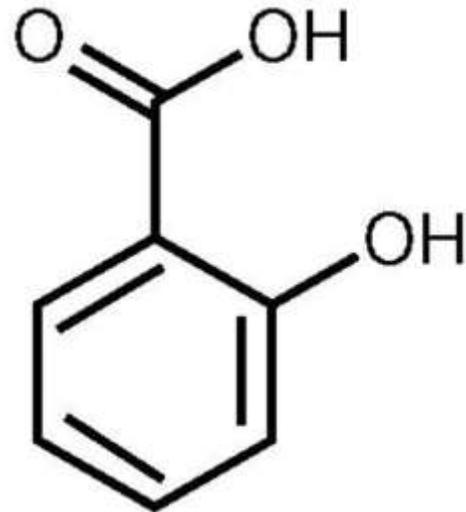
Елгаева Елизавета, кафедра информационной биологии
ФЕН НГУ

Руководитель: Миронова Виктория Владимировна, к. б. н.,
зав. сектором системной биологии морфогенеза растений

2018 г.

Салициловая кислота - гормон стресса растений

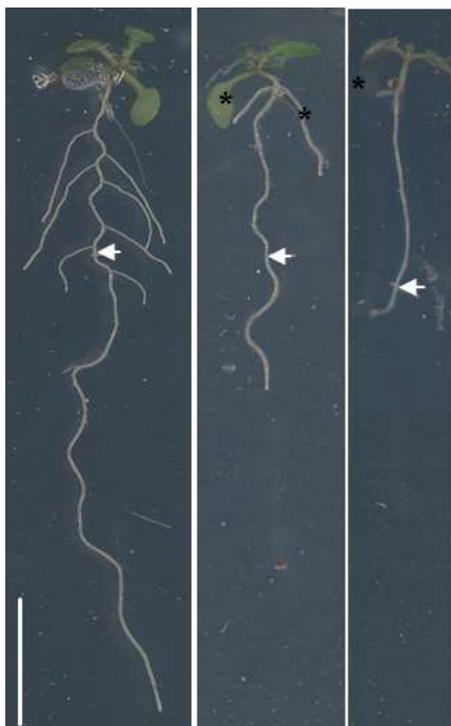
- ▶ Является регулятором ответа на биотический (патогены) и абиотический (засуха, холод, засоление) стресс
- ▶ Активирует Системную Приобетенную Устойчивость (СПУ) растения к патогенам



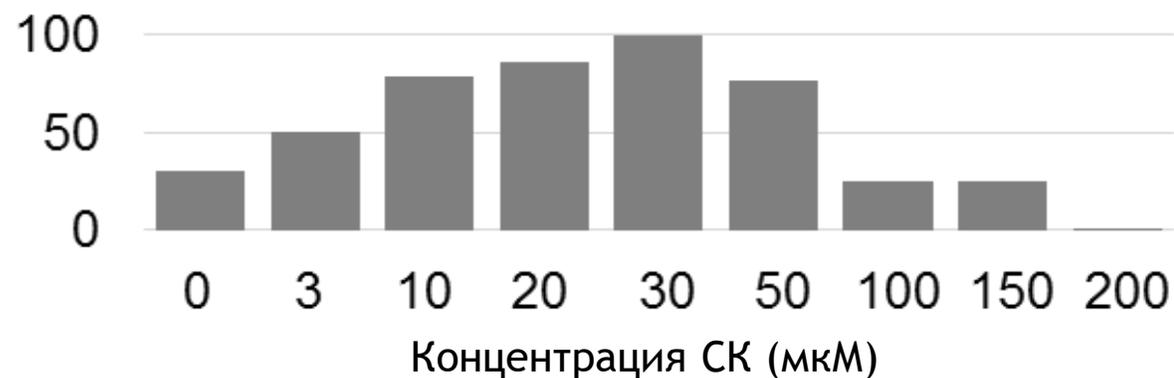
Салициловая кислота - регулятор морфогенеза

- ▶ В норме присутствует в растительных клетках (физиологическая концентрация для *A. thaliana* L. составляет 0.25 - 1 мкг/г, для *Solanum lycopersicum* L. - 1.39 - 4.9 мкг/г)
- ▶ Контроль над образованием семян, их прорастанием, вегетативным ростом, цветением, старением
- ▶ Эффекты от воздействия экзогенной салициловой кислоты (СК) зависят от ее концентрации

Контроль 30 мкМ 150 мкМ

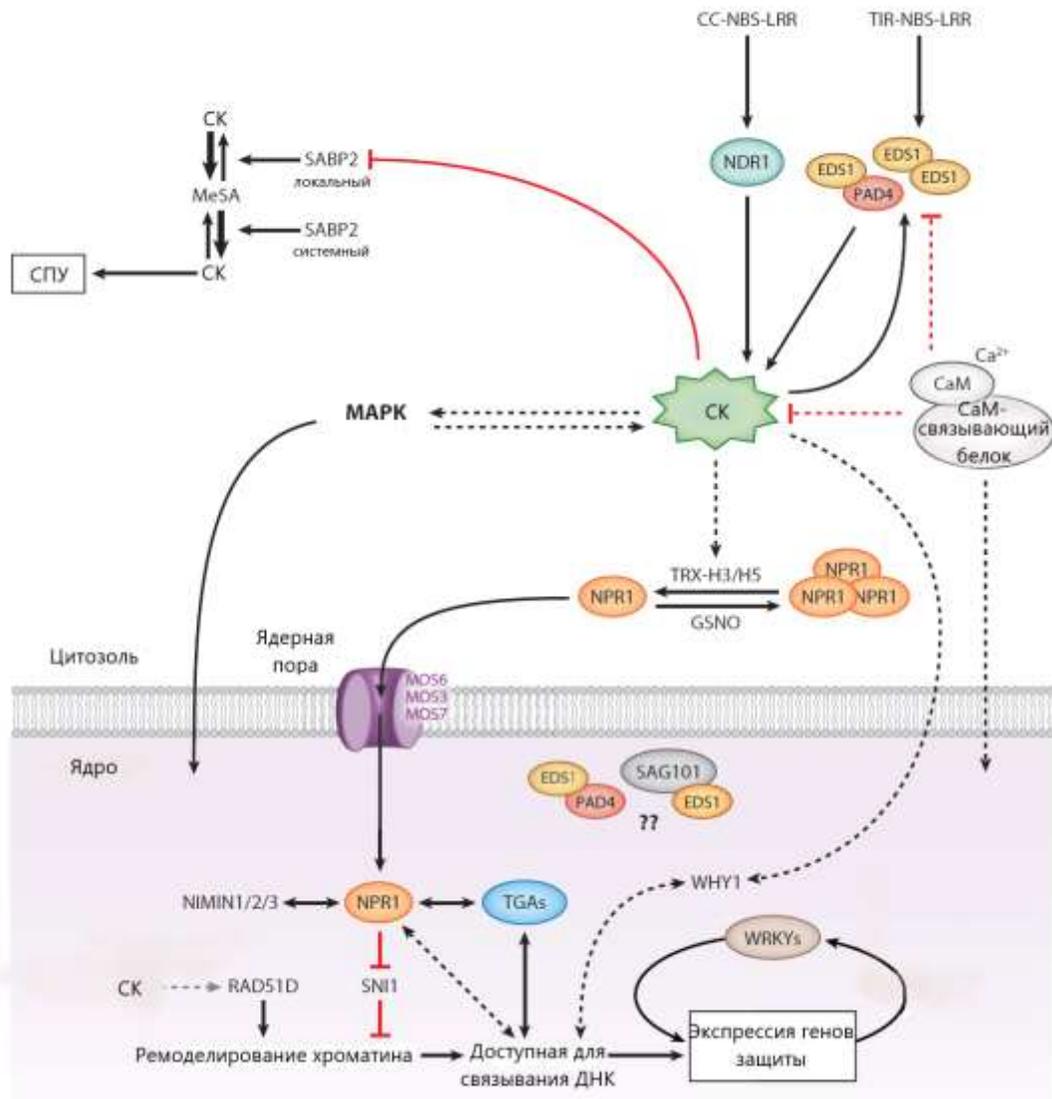


Процент растений с
придаточными корнями

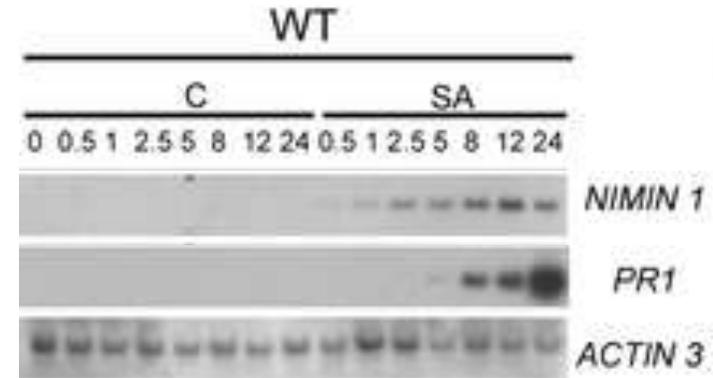


Молекулярно-генетические механизмы действия СК

Высокие концентрации СК



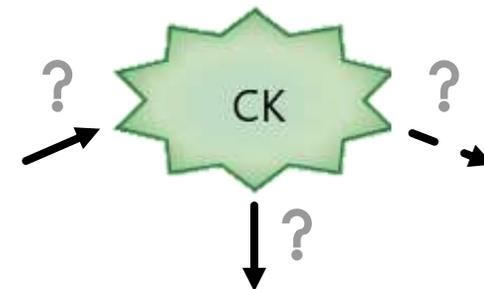
(адаптировано из Vlot et.al., 2009)



(Blanco et.al., 2009)

Эта регуляция показана только для очень высоких концентраций СК (200-500 μ M)!

Низкие концентрации СК



Цели и задачи

Цель: выявить гены-мишени в пути передачи сигнала низких концентраций салициловой кислоты в раннем и позднем ответе в корне *Arabidopsis thaliana* L.

Задачи:

- 1) Провести биоинформатический анализ RNA-Seq эксперимента по действию экзогенной СК в корне *A. thaliana* (1 ч и 6 ч, 20 мкМ)
- 2) Выявить гены-мишени в раннем и позднем транскрипционном ответе на низкие концентрации СК
- 3) Провести функциональную аннотацию генов-мишеней в раннем и позднем ответе на низкие концентрации СК

Материалы: RNA-Seq эксперимент

~ 150 штук 3-дневных проростков поместили на жидкую питательную среду с 20 мкМ СК (3 повтора, опыт) и без СК (3 повтора, контроль)

Инкубировали в течение 1 и 6 часов

Обработали растения жидким N₂, взяли корни

Провели RNA-seq на платформе Illumina-HiSeq4000 (BGI Tech)

Схема работы и методы

1

Контроль
качества
(FASTQC)

2

Предобработка
данных
(Trimmomatic)

3

Картирование
(STAR)

4

Анализ диф.
экспрессии
генов для 1ч и
6ч обработки
(DESeq2, Edge-
R)

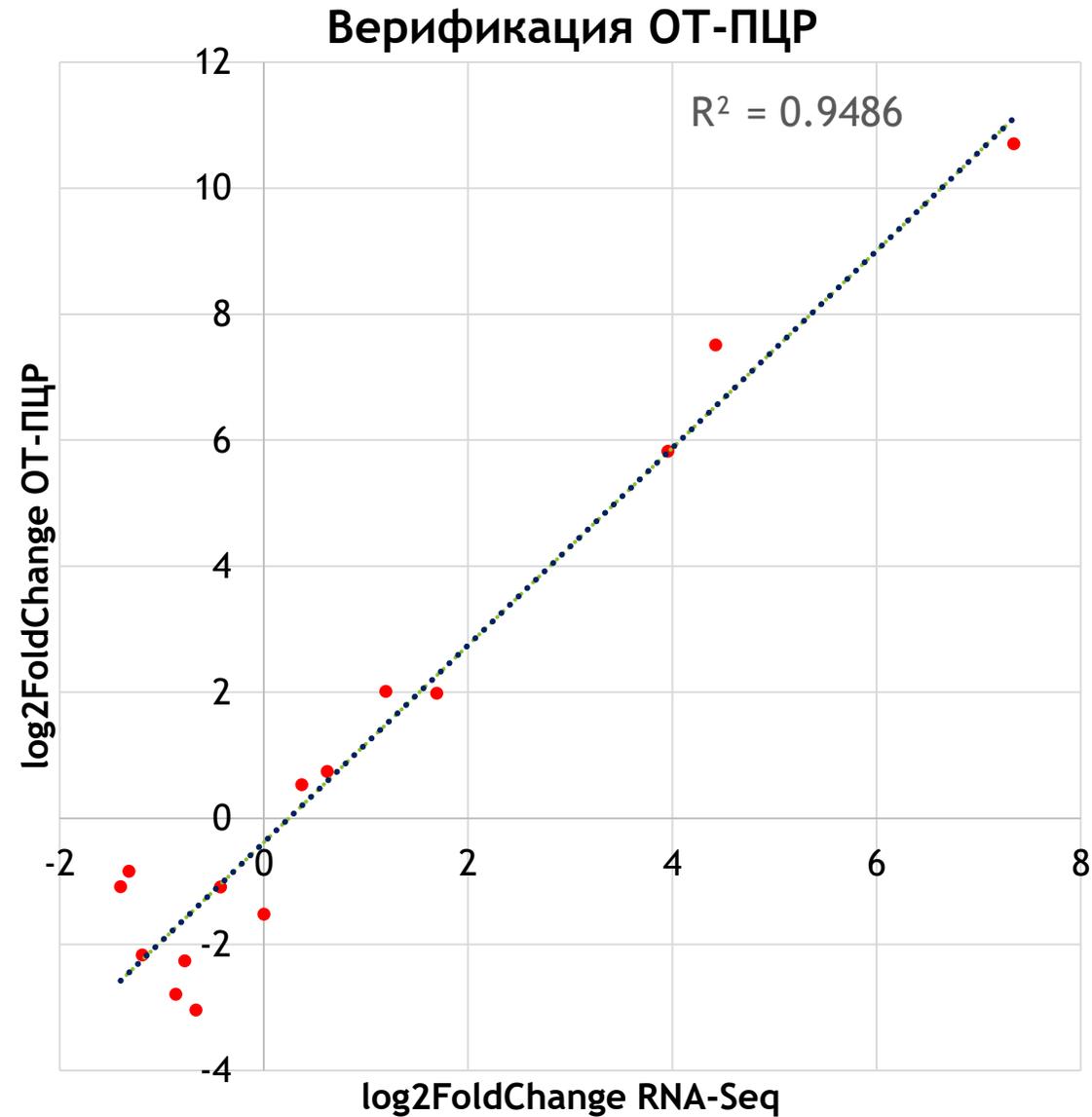
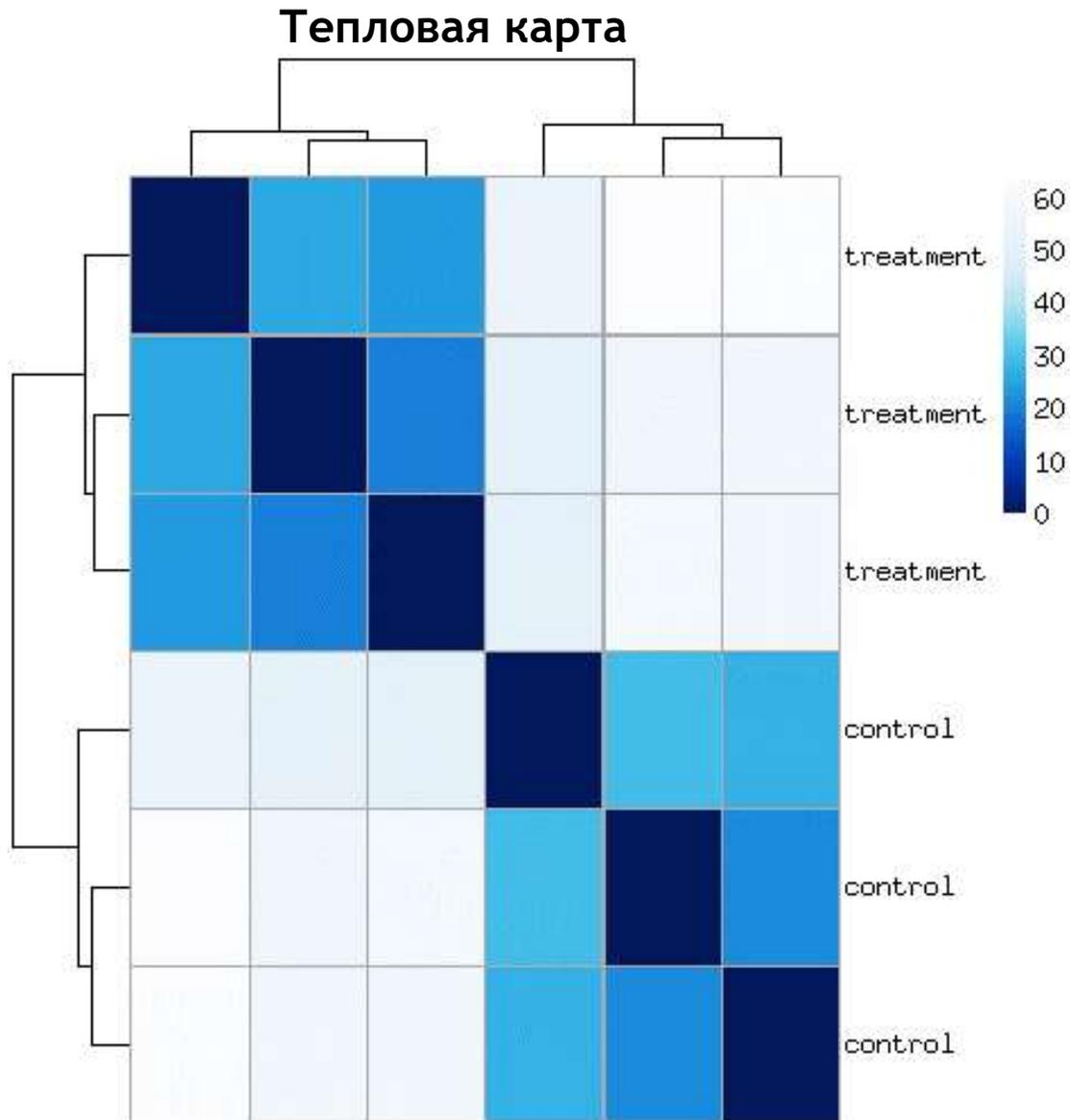
5

Функциональная
аннотация
(AgriGO, DAVID)

6

Биологические
выводы

Анализ RNA-Seq данных (6 ч)

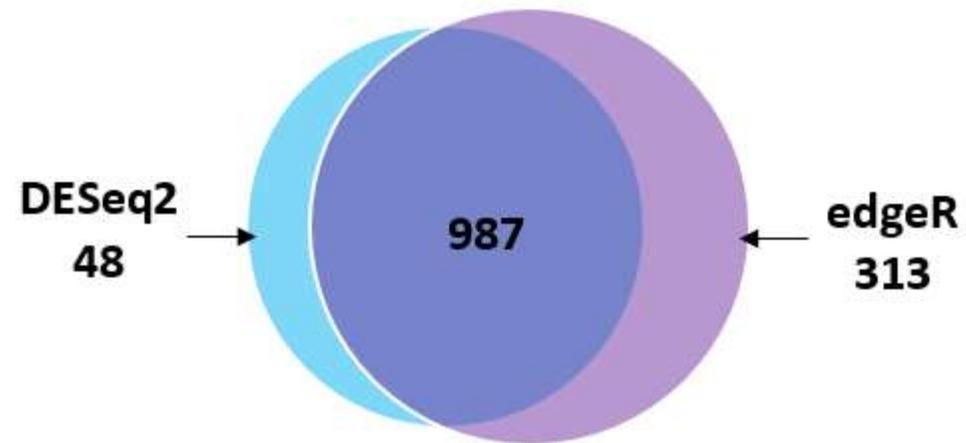
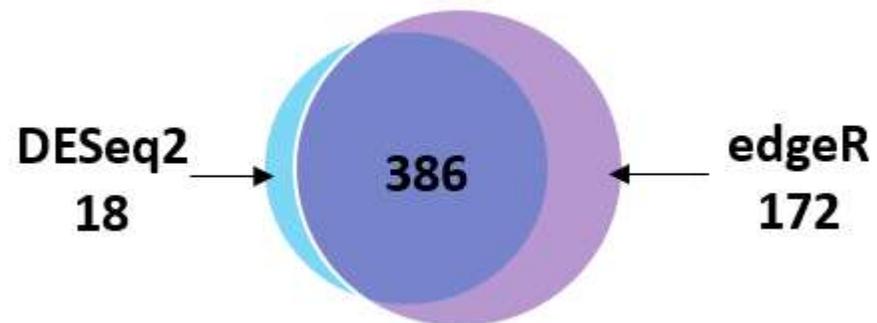


Анализ дифференциальной экспрессии генов

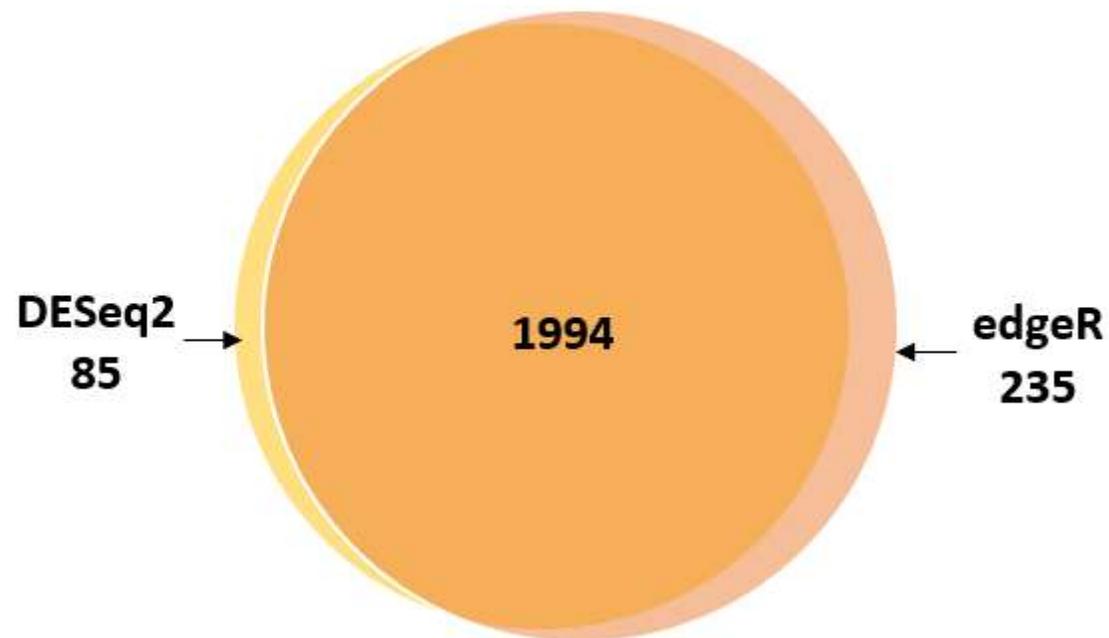
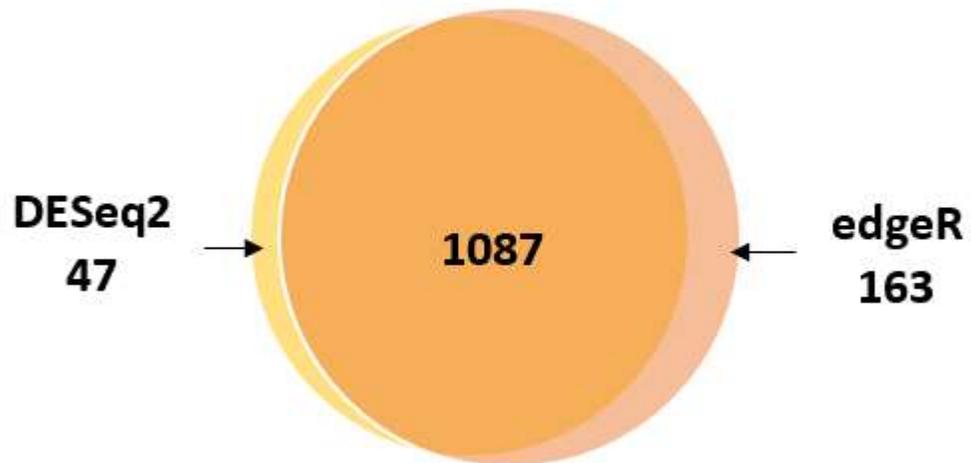
1ч

6ч

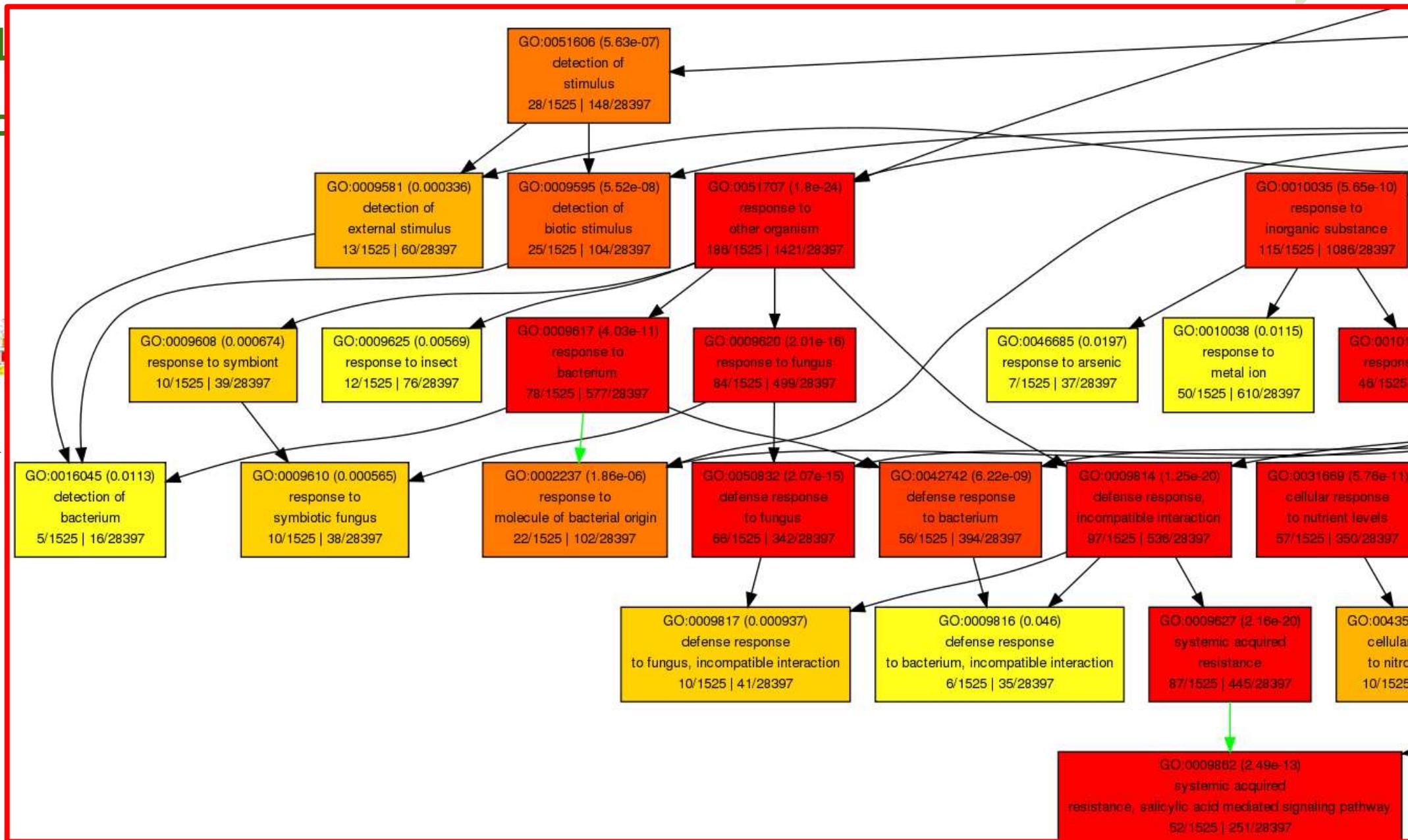
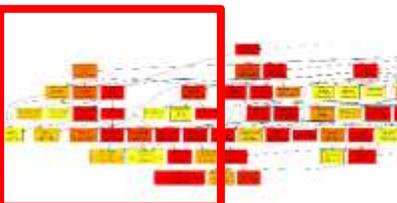
Подавление



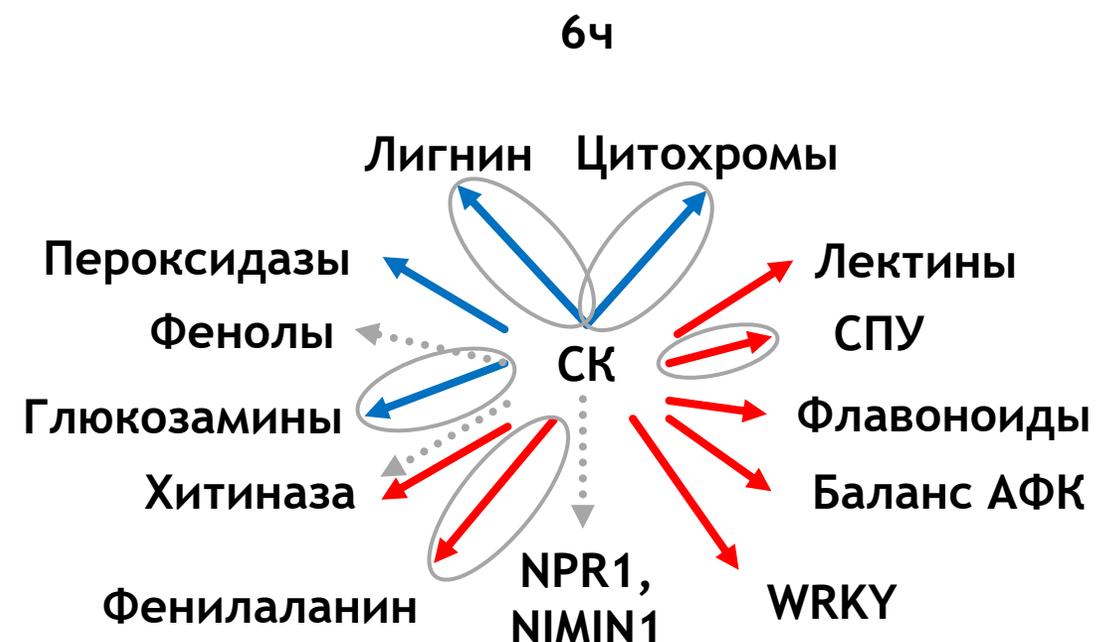
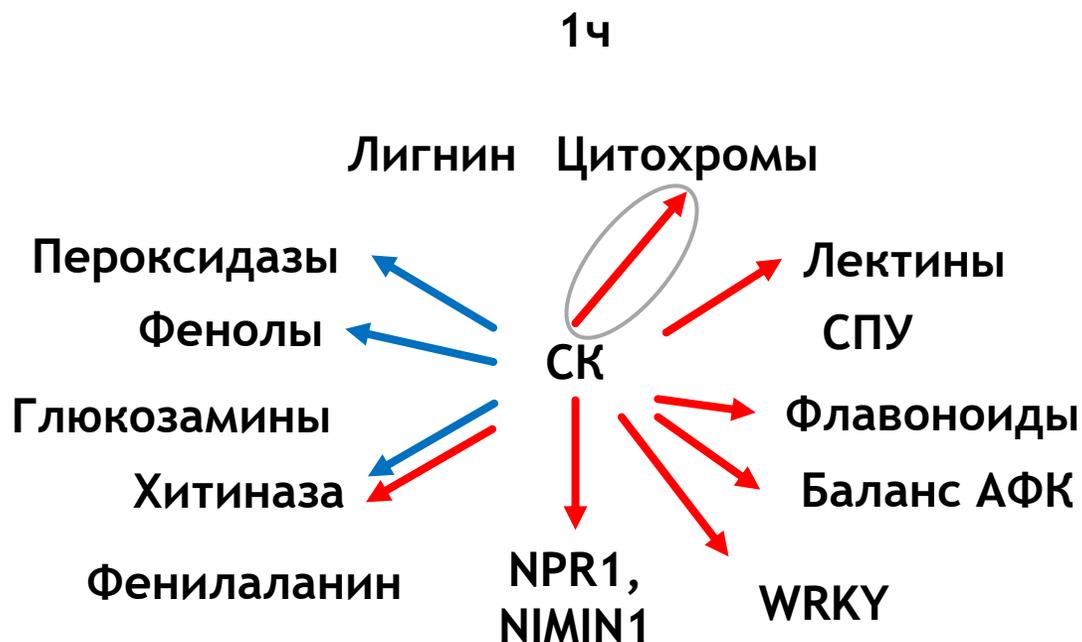
Активация



Функции данные



Влияние СК на защитные реакции растения (AgriGo, DAVID)



→ - активация → - подавление ... - отличия
 АФК - активные формы кислорода

СПУ - системная приобретенная устойчивость к патогенам

Уже в раннем ответе на низкие концентрации СК активируется множество защитных реакций, в том числе через белки NPR1, NIMIN1, WRKY - участников сигнального пути высоких концентраций СК.

Взаимодействие сигнальных путей СК и других фитогормонов



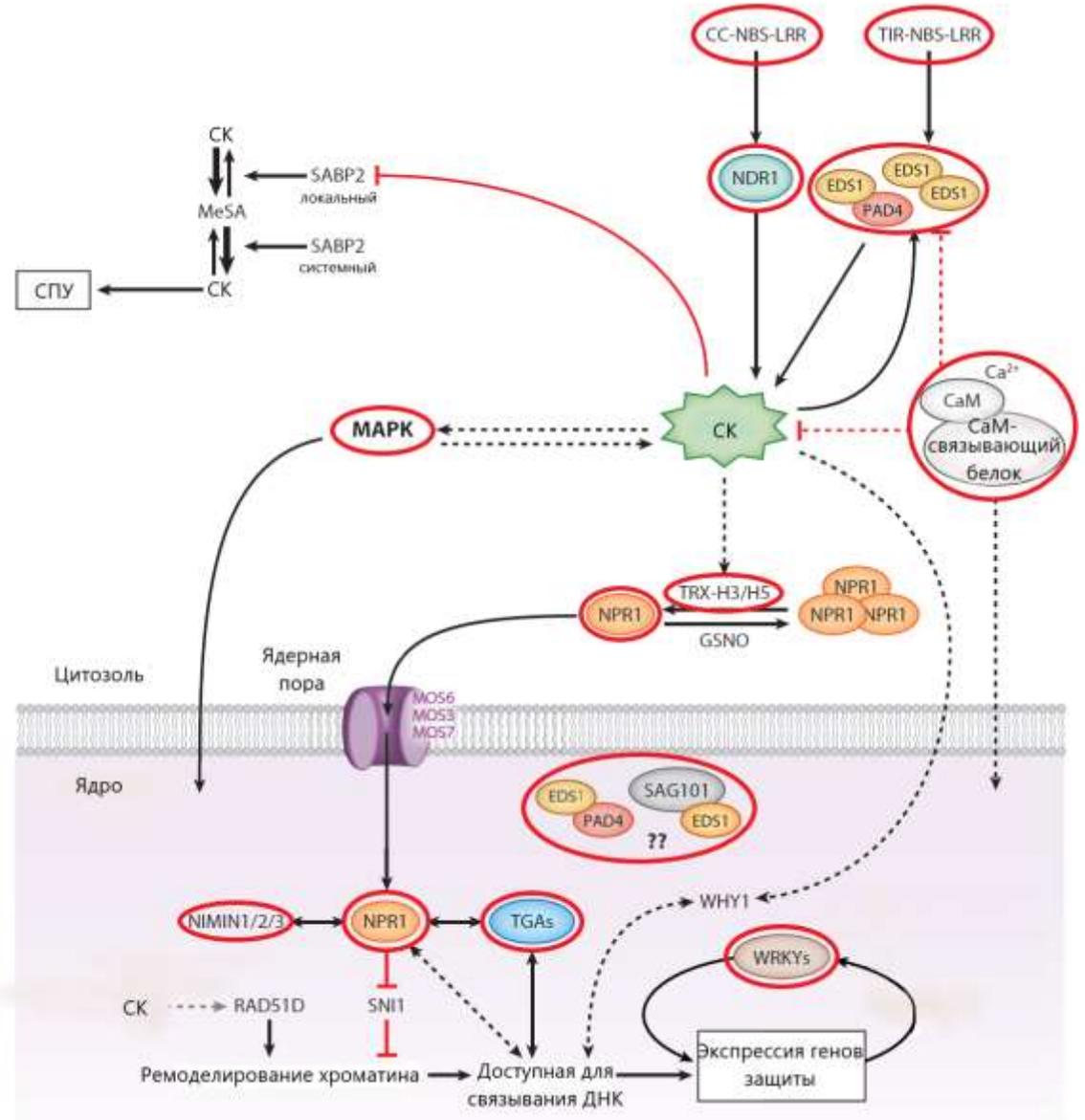
→ - активация → - подавление ... - отличия

ЖК - жасмоновая кислота

АБК - абсцизовая кислота

Взаимодействие сигнальных путей СК и других гормонов наиболее разнообразно в раннем ответе. Даже после 1 ч обработки низкими концентрациями СК активируется ответ на СК.

Молекулярно-генетический механизм действия низких концентраций СК



Низкие концентрации СК готовят клетку к воздействию высоких концентраций?

— - активация в раннем ответе на низкие концентрации СК

(адаптировано из Vlot et al., 2009)

Выводы

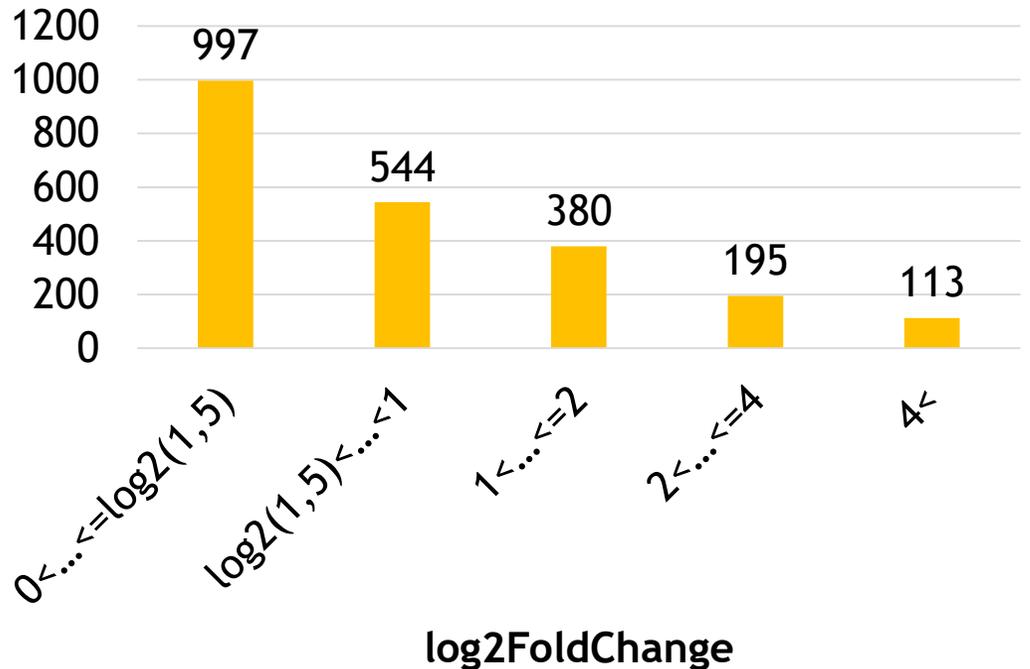
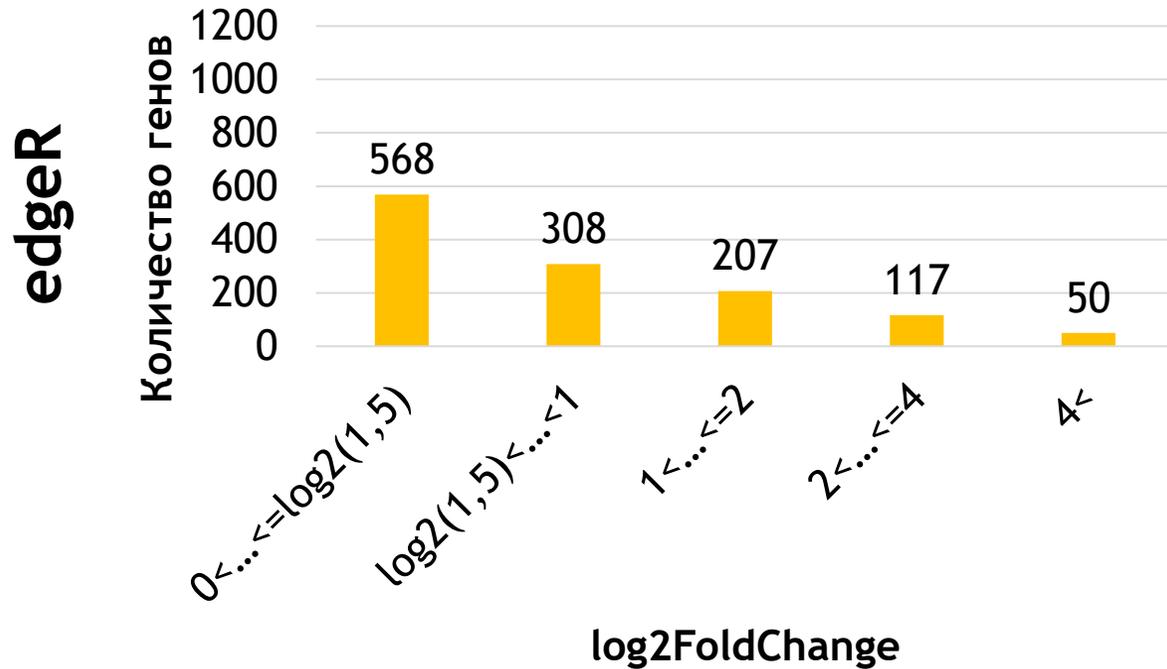
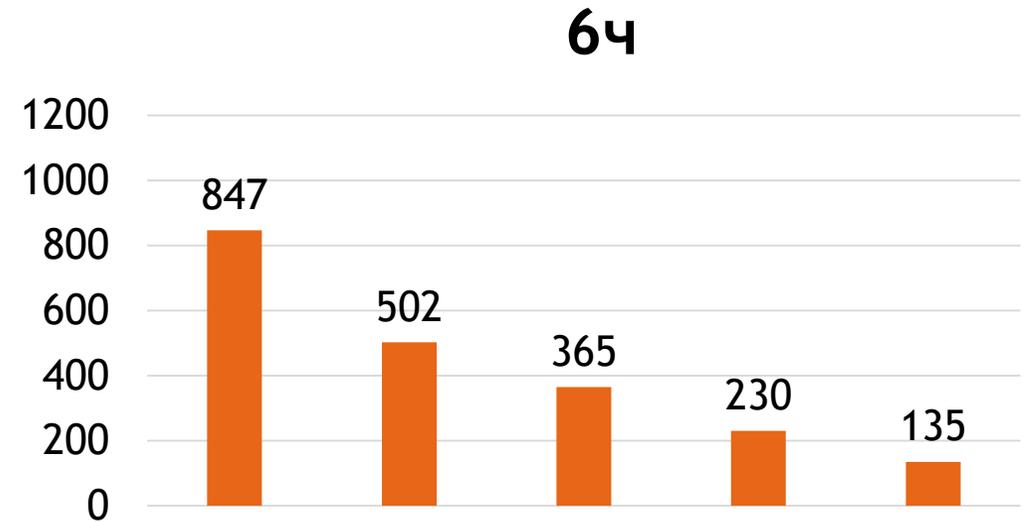
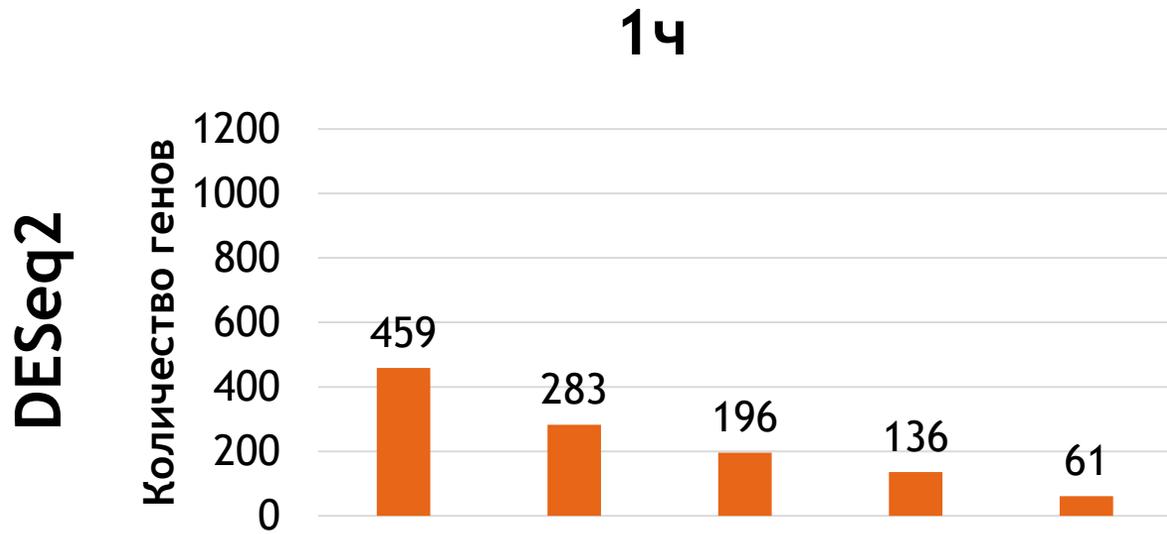
- ▶ Биоинформатический анализ RNA-Seq экспериментов по 1- и 6-часовой обработке корней *Arabidopsis thaliana* экзогенной салициловой кислотой (СК) в концентрации 20 мкмоль/л показал активацию значительного числа генов (1538 и 3114), что более чем в три раза превышает количество подавляемых генов (404 и 987).
- ▶ Среди мишеней низких концентраций СК обнаружены известные участники пути передачи сигнала высоких концентраций СК (>100 мкмоль/л): рецепторы NPR1, NPR3-4; корегуляторы NIMIN1-3; транскрипционные факторы WRKY.
- ▶ Уже через один час обработки, экзогенная СК (20 мкмоль/л) запускает в корне множество независимых защитных реакций через лектины, цитохромы, активные формы кислорода, хитиназу и другое. Через шесть часов обработки СК снижается роль цитохромов и добавляется защитная реакция от флавоноидов и фенилаланина.
- ▶ Экзогенная СК (20 мкмоль/л) вызывает подавление передачи сигналов от фитогормонов этилена, гиббереллина, цитокинина. Передача сигналов абсцизовой кислоты активируется в раннем ответе, но ингибируется в позднем. Ответ на жасмоновую кислоту и ауксин как подавляется, так и активируется в раннем и позднем ответах.

Благодарю за внимание!

Первичный анализ СК-индуцированного транскриптома

- ▶ **Первичный контроль качества:** степень покрытия 21 - 22М, GC-состав 45%, 100 п. н., score>25, k-меры на 5'- и 3'-концах ридов - фрагменты адаптеров.
- ▶ **Предобработка ридов в Trimmomatic** для удаления фрагментов адаптеров (ILLUMINACLIP).
- ▶ **Повторный контроль качества:** количество k-меров сократилось, препроцессинг существенно не повлиял на длину ридов и не сказалось на качестве данных.
- ▶ **PE-картирование ридов:** для каждой реплики картировалось более 42М ридов (96%), 94% ридов картировалось уникально.

Степени изменения экспрессии ДЭГ, активация в ответ на СК



Функциональная аннотация ДЭГ (1ч, DESeq2)

Подавление

- ▶ Защита: пероксидазная активность, фенолы, ответ на биотические и абиотические стимулы, ответ на хитин
- ▶ Ответ на фитогормоны: этилен-активируемый сигнальный путь, репрессия сигнала на ауксин, конъюгация ауксина, ответ на гиббереллины, цитокинин, жасмоновую и абсцизовую кислоту, brassinosteroids
- ▶ Морфогенез: развитие корневой системы, боковых корней, дифференцировка трихобластов и эпидермальных клеток корня, удлинение корневых волосков
- ▶ Клеточные процессы: фотосинтез, клеточный транспорт воды, морфогенез клеток, биогенез клеточной стенки
- ▶ Регуляция экспрессии: упаковка хроматина
- ▶ Биосинтез гормонов: СК, ауксина
- ▶ Передача сигнала

Активация

- ▶ Защита: лектины, цитохромы, флавоноиды, баланс активных форм кислорода, WRKY, NPR1, NIMIN1, метаболизм хитина, ответ на стресс, повреждения, биотические и абиотические стимулы
- ▶ Ответ на фитогормоны: СК, жасмоновую кислоту; сигнальный путь, активируемый абсцизовой кислотой, ауксин
- ▶ Морфогенез: старение, развитие листьев
- ▶ Клеточные процессы: аутофагия (негативная регуляция клеточной гибели)
- ▶ Передача сигнала

Функциональная аннотация ДЭГ (6ч, DESeq2)

Подавление

- ▶ **Защита:** цитохромы, пероксидазная активность, метаболизм лигнина, ответ на стресс, повреждения, биотические и абиотические стимулы
- ▶ **Ответ на фитогормоны:** ответ на гибберелины, абсцизовую кислоту, цитокинин, транспорт ауксина
- ▶ **Морфогенез:** развитие корневой системы, боковых корней, дифференцировка трихобластов и эпидермальных клеток корня, удлинение корневых волосков
- ▶ **Клеточные процессы:** биогенез клеточной стенки, транспорт воды, клеточный рост
- ▶ **Биосинтез гормонов:** brassinosteroids

Активация

- ▶ **Защита:** СПУ, лектины, баланс активных форм кислорода, WRKY, метаболизм хитина, флавоноидов и фенилаланина, ответ на стресс, повреждения, биотические стимулы, катаболизм глюкозамино-содержащих соединений
- ▶ **Ответ на фитогормоны:** ответ на СК, СК-индуцируемый сигнальный путь, ауксин; сигнальный путь, индуцируемый жасмоновой кислотой
- ▶ **Морфогенез:** старение
- ▶ **Клеточные процессы:** аутофагия, деление клеток, клеточных ядер
- ▶ **Биосинтез гормонов:** СК
- ▶ **Передача сигнала**
- ▶ **Симбиоз:** симбиоз, в том числе мутуализм через паразитизм; положительная регуляция симбионтом иммунной системы хозяина; положительная регуляция организмом иммунного ответа других организмов. вовлеченных в симбиотические отношения; запрограммированная гибель клеток хозяина, индуцируемая симбионтом