

Метаанализ транскриптомных данных дуба черешчатого в условиях абиотического и биотического стресса

Вишняков С.А., Олейников А.А., Крылов П.А.

ФНЦ агроэкологии РАН, Волгоград, Россия

Аннотация. В естественных условиях на растения воздействует комплекс неблагоприятных факторов внешней среды, в ответ на которые изменяется РНК-профиль. На сегодняшний день проводятся исследования РНК-профилей в условиях воздействия одного фактора, однако работ по метаанализу ответных реакций у дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) не проводилось. В связи с этим целью нашего исследования стало проведение метаанализа данных экспрессии генов RNA-Seq, связанных с засухой, стрессом от заражения мучнистой росой и поедания насекомыми для выявления дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), включая транскрипционные факторы (ТФ). В результате было обнаружено четыре перекрёстных ДЭГ при воздействии всех стресс-факторов: histone H4, flavonol synthase, acyltransferase GLAUCE-like и неохарактеризованный ген, содержащий домен DUF1223. Результаты анализа РНК-профилей с помощью программы iTAK v1.6 показали участие 225 ТФ, из которых 159, ассоциированы с ответом на поедание насекомыми, 24 ТФ, связанных с поражением мучнистой росой и 42 ТФ, участвующих в реакции на засуху. Было обнаружено, что происходит подавление четырех общих ТФ при засухе и повреждении насекомыми. При стрессах вызванными мучнистой росой и насекомыми выявлено 9 ТФ, среди которых с повышенной экспрессией были три гена WRKY и по одному из семейств AP2/ERF, NAC, MYB и GRAS, оставшиеся два ТФ принадлежали семейству MYB-related. Пересечения в экспрессии ТФ между засухой и мучнистой росой не обнаружено. Результаты анализа коэкспрессии (WGCNA) позволили выявить 14 модулей из которых шесть обладали наибольшей связью с признаком и были использованы для дальнейшего определения генов-хабов. В результате анализа коэкспрессии было выявлено шесть генов-хабов, из них три автоматически аннотированных NAC, GDSL, CESA3 и оставшиеся не охарактеризованные. Результаты метаанализа показали, что устойчивость растения к различным стрессам обеспечивается как специфическими, так и общими механизмами, при этом ключевую роль играют коэкспрессионные модули и ТФ, что позволяет выделить потенциальные гены кандидаты для дальнейших исследований и селекции.

Ключевые слова: метаанализ, RNA-seq, WGCNA, дуб черешчатый, засуха, мучнистая роса, насекомые-вредители

ВВЕДЕНИЕ

Растения постоянно подвергаются комбинированному воздействию биотических и абиотических стрессов, что наносит значительный ущерб лесному хозяйству. Изменение климата усиливает их негативный эффект, увеличивая экономические потери [1, 2]. Особенно уязвимы деревья из-за их долгого жизненного цикла, и дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – не исключение. Этот вид, широко распространённый в

Европе, имеет ключевое экологическое и экономическое значение: он поддерживает биоразнообразие, обеспечивая укрытие и пищу для множества видов [3], а его ценная древесина активно используется в промышленности [4]. Дубы хранят значительное количество углерода в своей древесине, листьях и корнях, помогая сократить выбросы парниковых газов в атмосферу и смягчить глобальное потепление климата [5]. Дубы выполняют важную гидрологическую функцию, способствуя регуляции водного баланса экосистем и предотвращая деградацию территорий [6, 7]. В настоящее время дубовые насаждения находятся под угрозой и сокращаются во многих районах из-за сочетания плохих погодных условий, фитопатогенов, вспышек насекомых-вредителей и повторяющейся сильной дефолиации, связанной в том числе с изменением климата [8].

Молекулярно-генетические механизмы дуба черешчатого активно изучаются при воздействии на него биотических и абиотических стрессов, включая заражение патогенами, воздействие насекомых-вредителей, засуху, засоленность почвы и высокую температуру [9–14]. Однако, несмотря на изученность влияния отдельных стрессов, комплексное воздействие на дуб черешчатый остаётся малоисследованным. Поиск и анализ дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), включая транскрипционные факторы (ТФ) могут быть использованы в качестве основы для получения новых форм дуба черешчатого с улучшенной устойчивостью к тем или иным стресс-факторам с помощью геномных технологий. В связи с этим крайне важно изучить реакцию дуба черешчатого на неблагоприятные факторы внешней среды для раскрытия его механизмов адаптации на молекулярно-генетическом уровне [15].

В связи с этим целью исследования стало проведение метаанализа данных экспрессии генов RNA-Seq, связанных с засухой, стрессом от заражения мучнистой росой и поедания насекомыми для выявления ДЭГ, включая ТФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор данных, контроль качества и картирование

Необработанные данные РНК-секвенирования, отражающие изменения экспрессии генов в листьях у дуба черешчатого при различных стрессовых условиях, были загружены из архивов NCBI SRA (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) и European Nucleotide Archive Browser (www.ebi.ac.uk/ena/browser/home) по результатам трёх исследований [16–18]. Данные RNA-seq Illumina включают информацию об экспрессии генов при стрессе, вызванном дубовой зеленой листовёрткой (*Tortrix viridana* L.) – PRJEB1903 (4 образца, состоящие из 2 стрессированных и 2 контрольных), при стрессе от проникновения мицелия мучнистой росы – PRJNA1161636 (6 образцов, состоящие из 4 стрессированных и 2 контрольных) и при воздействии стресса от засухи – PRJNA450334 (5 образцов, состоящие из 3 стрессированных и 2 контрольных). В исследование были также включены данные RNA-seq полученные нами ранее с помощью нанопорового секвенирования (ONT) у дуба черешчатого в условиях моделируемой засухи – PRJNA1202660 (3 образца, состоящие из 2 стрессированных и 1 контрольного образцов).

Качество данных РНК-секвенирования Illumina проверялось с помощью FastQC, для ONT использовался NanoPlot. Согласно отчетам FastQC и NanoPlot, качество исходных данных секвенирования, представленных в SRA, было достаточным для дальнейшего анализа, поэтому не было необходимости в предварительной обработке и обрезке исходных данных экспрессии. Для метаанализа было сформировано четыре группы наборов данных: контроль, засуха, заражение мучнистой росой и повреждение насекомыми-вредителями.

Референсный геном дуба черешчатого (GCF_932294415.1) и аннотации в форматах FASTA и GFF были загружены из базы данных NCBI RefSeq. Проверенные прочтения

были сопоставлены с референсной последовательностью генома с помощью HISAT2 для Illumina [19] и minimap2 для ONT [20].

Количественная оценка и нормализация данных экспрессии

Для подсчета прочтений использовался инструмент featureCounts [21]. EdgeR использовался для нормализации данных подсчета, полученных из featureCounts, методом ТММ (Trimmed Mean of M -values). Пакет R edgeR реализует эмпирические методы байесовской модерации, чтобы обеспечить надежный вывод при небольшом количестве репликаций [22]. При построении матрицы дизайна были учтены факторы партии с целью исключения технической вариации и сохранения достоверности биологического анализа.

Гены считались дифференциально экспрессируемыми, если коэффициент ложного обнаружения $FDR < 0.05$, а модуль логарифмированного значения изменения уровня экспрессии гена $|\log FC| > 1$.

Поиск факторов транскрипции среди ДЭГ и анализ генной онтологии

Нуклеотидные последовательности значимых ДЭГ дуба черешчатого были проанализированы с помощью программы для идентификации факторов транскрипции растений, репрессоров транскрипции и киназ iTAK v1.6 [23].

Для функциональной аннотации генов был применен инструмент eggNOG-mapper v2 с использованием базы данных eggNOG 5.0 [24, 25]. Анализ обогащения GO и KEGG был выполнен с использованием пакета clusterProfiler для языка программирования R.

Анализ модулей совместной экспрессии генов

Для выявления модулей генов с согласованными профилями экспрессии был применен метод взвешенного анализа коэкспрессионных генетических сетей (Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA) [26]. Данный подход позволяет идентифицировать кластеры (модули) генов с высокой корреляцией и связать их с биологическими условиями. Анализ был проведен с использованием следующих параметров: пороговое значение связи (soft threshold) – 15, чувствительность разделения модулей (deepSplit) – 1, порог слияния модулей (mergeCutHeight) – 0.1, минимальный размер модуля – 50 генов.

Для визуализации сети коэкспрессии в интересующем нас модуле использовалась программа Cytoscape v3.10.2 [27]. Файл, содержащий узлы (гены) и вес (силу коэкспрессии между двумя узлами), полученный в результате анализа WGCNA, использовался в качестве входных данных для Cytoscape. Ключевые гены хабы были найдены с помощью плагина для Cytoscape Cyto-Hubba методом максимальной кликовой центральности (MCC) [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск ДЭГ и ТФ

В результате анализа дифференциальной экспрессии было обнаружено 1732 ДЭГ при стрессе от засухи, 2072 при поедании насекомыми, 560 при заражении мучнистой росой, при $FDR < 0.05$ и $|\log FC| > 1$. Нормализованные значения статистически значимых ДЭГ и соответствующие графические материалы приведены в дополнительных материалах ([рис. S1](#), [табл. S1](#)).

Мы выполнили перекрестный анализ ДЭГ в трех наборах данных, чтобы выявить гены, участвующие в реакции Дуба черешчатого при трёх типах стресса. Результаты анализа показали, что большинство ДЭГ были специфичны для отдельных стрессов, однако 4 гена (LOC126731645 – histone H4, LOC126702476 – flavonol synthase/flavanone

3-hydroxylase, LOC126709605 – acyltransferase GLAUCE-like, LOC126694877 – ген, содержащий домен DUF1223) дифференциально экспрессировались в трёх группах (рис. 1). Полный список перекрёстных ДЭГ со значениями logFC представлен в дополнительных материалах (табл. S2).

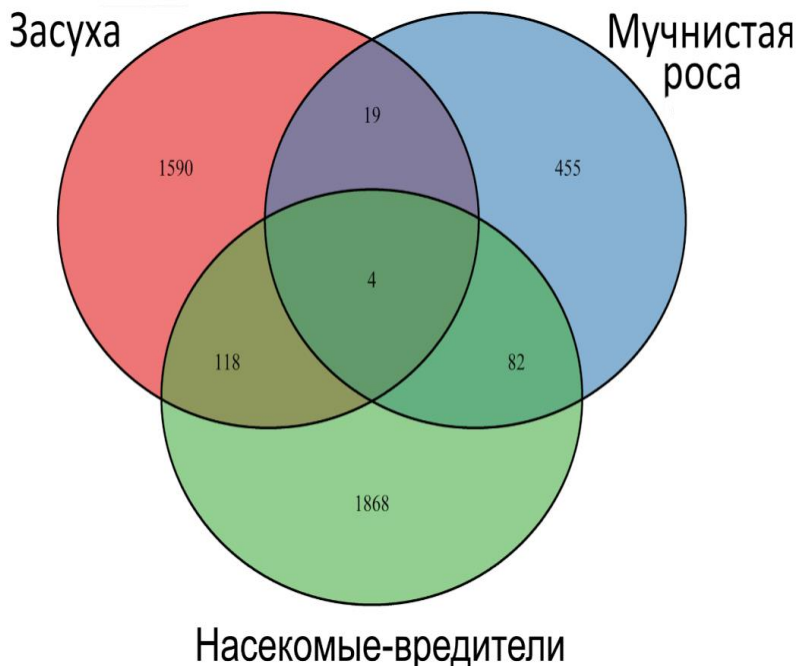


Рис. 1. Диаграмма Венна, показывающая количество ДЭГ, участвующих при стрессе от засухи, при заражении мучнистой росой и насекомыми-вредителями

Среди выявленных ДЭГ были идентифицированы ТФ, из которых 159, ассоциированы с ответом на поедание насекомыми, 24, связанных с поражением мучнистой росой и 42, участвующих в реакции на засуху (рис. 2). Наибольшее количество транскрипционных факторов в трёх группах принадлежало к семействам MYB, WRKY, AP2/ERF, NAC и bHLH.

При сравнении перекрывающихся ДЭГ для трёх типов стрессов не было обнаружено общих ТФ. Между засухой и мучнистой росой общих ТФ также не выявлено, тогда как между засухой и повреждением насекомыми обнаружено 3 фактора (GARP, Trihelix, C2C2), экспрессия которых подавлялась только при засухе, и один MYB-related, подавлялся при обоих стрессах. В то же время для пересечения между мучнистой росой и повреждением насекомыми выявлено 9 ТФ, среди которых с повышенной регуляцией были 3 гена WRKY и по одному из семейств AP2/ERF, NAC, MYB и GRAS, оставшиеся 2 ТФ принадлежали семейству MYB-related и имели пониженную экспрессию.

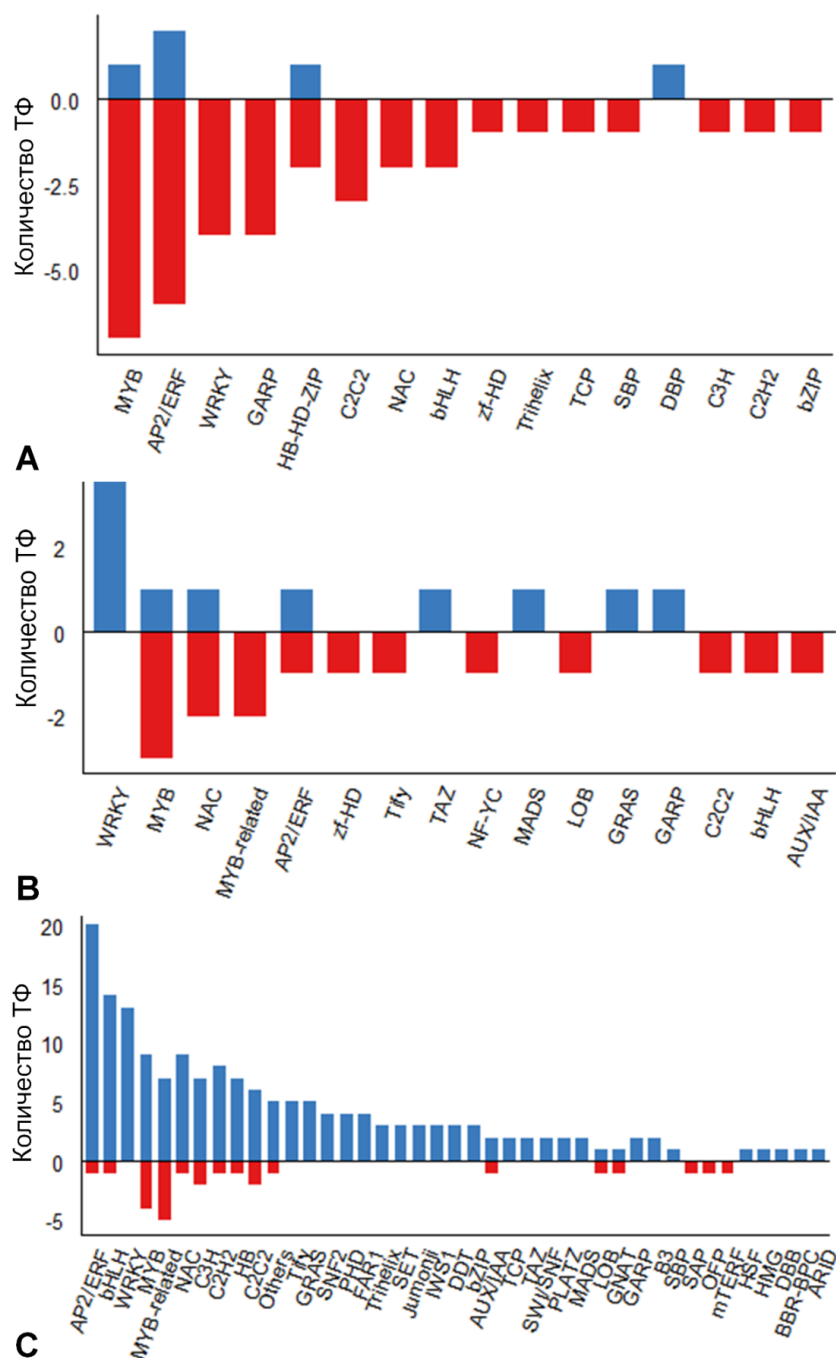


Рис. 2. Количество дифференциально экспрессируемых ТФ. Синий цвет обозначает повышенную регуляцию, красный – пониженную. Гистограммы представлены для групп засуха (А), мучнистая роса (В), поражение насекомыми-вредителями (С) у дуба черешчатого

Анализ обогащения геной онтологии для ДЭГ

Для изучения изменений экспрессии генов в ответ на различные негативные факторы окружающей среды был проведён анализ обогащения терминов GO. Это позволило определить биологические процессы, клеточные компоненты и молекулярные функции, отражающие ответ растения на три типа стресса. Подробные результаты представлены на рисунке 3.

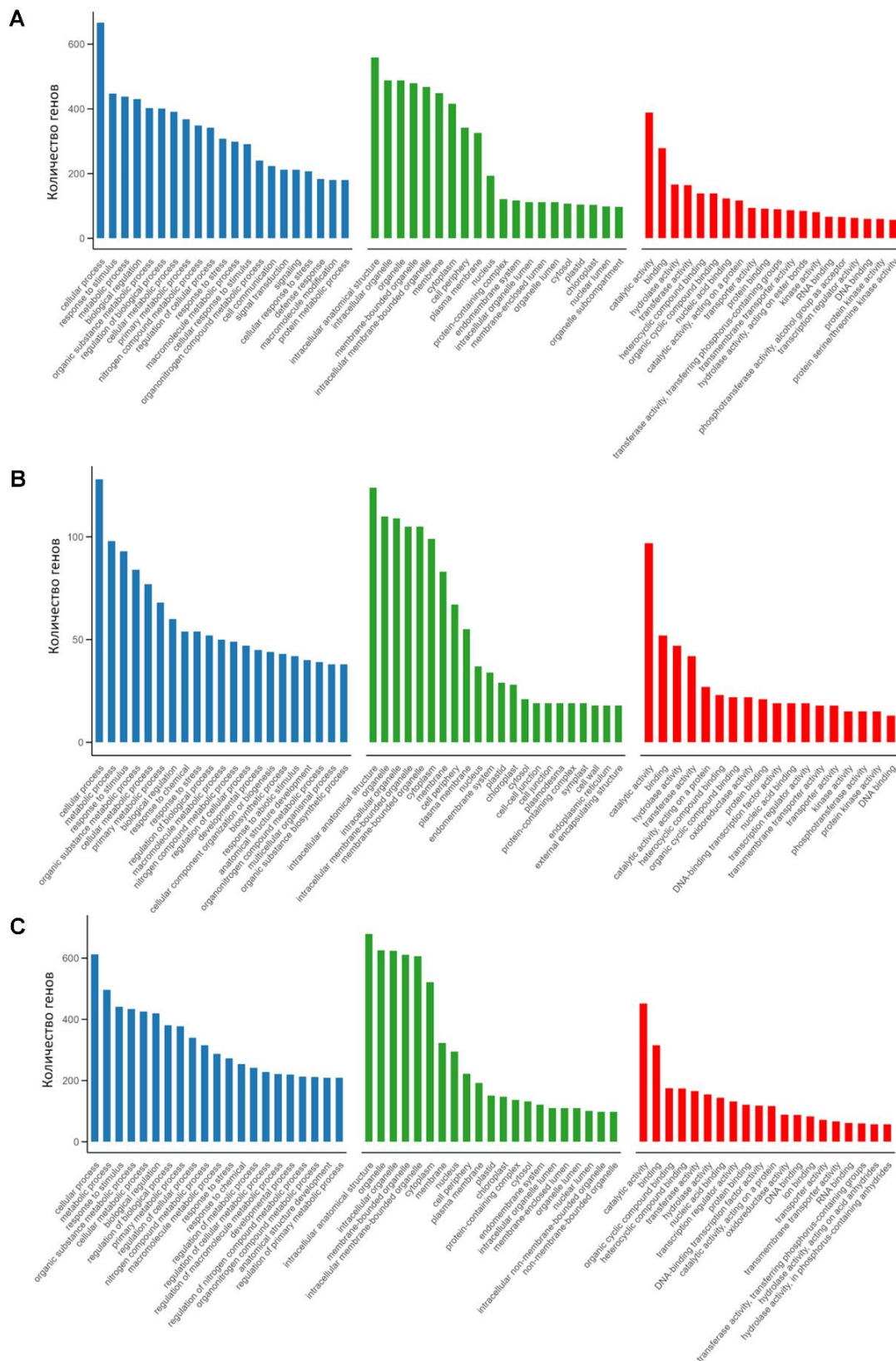


Рис. 3. Анализ обогащения GO для ДЭГ при различных стрессовых условиях. На гистограммах показаны 20 наиболее обогащенных терминов генной онтологии в трех категориях: биологический процесс, клеточный компонент и молекулярная функция. По вертикальной оси представлены значения количества генов, а по горизонтальной оси представлены термины GO. Синий цвет обозначает GO-термины, ассоциированные с биологическими процессами, зелёный с клеточными компонентами, а красный с молекулярными функциями. Гистограммы представлены для групп засуха (А), мучнистая роса (В), поражение насекомыми-вредителями (С) у дуба черешчатого. [Открыть в полном размере](#)

Все три группы разделяют базовые процессы, такие как катализ, связывание белков и нуклеиновых кислот, а также транспортные механизмы у дуба черешчатого. На уровне биологических процессов значимо обогащены GO термины «cellular process» и «metabolic process», термины, связанные с адаптивными ответами на стресс, такие как «response to stimulus» и «response to stress», а также термины, связанные с метаболизмом органических соединений «organic substance metabolic process», «cellular metabolic process». Среди клеточных компонентов представлены термины «intracellular anatomical structure», «organelle», «membrane», что отражает их роль в структурной и функциональной адаптации дуба черешчатого к неблагоприятным факторам окружающей среды. GO термины, отражающие молекулярные функции преимущественно связаны с ферментативными процессами – «catalytic activity», молекулярным связыванием – «binding», регуляцией транскрипции и транспортом веществ через мембраны – «transcription regulator activity» и «transmembrane transporter activity». Список 20 наиболее представленных GO терминов представлен в дополнительных материалах (табл. S3).

Анализ сети коэкспрессии генов

Для выявления модулей совместно экспрессируемых генов был выполнен анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов с помощью WGCNA на трёх наборах данных RNA-seq, состоящих из 17 образцов. Каждая группа образцов была объединена методом Фишера, с использованием пакета metaRNASeq [29]. В результате ДЭГ были разделены на 14 различных модулей, указанных на рисунке 4 в левой колонке. Для каждой группы были определены значимые модули коэкспрессии генов, демонстрирующие значение корреляции выше 0.7 и *p*-value менее 0.01.

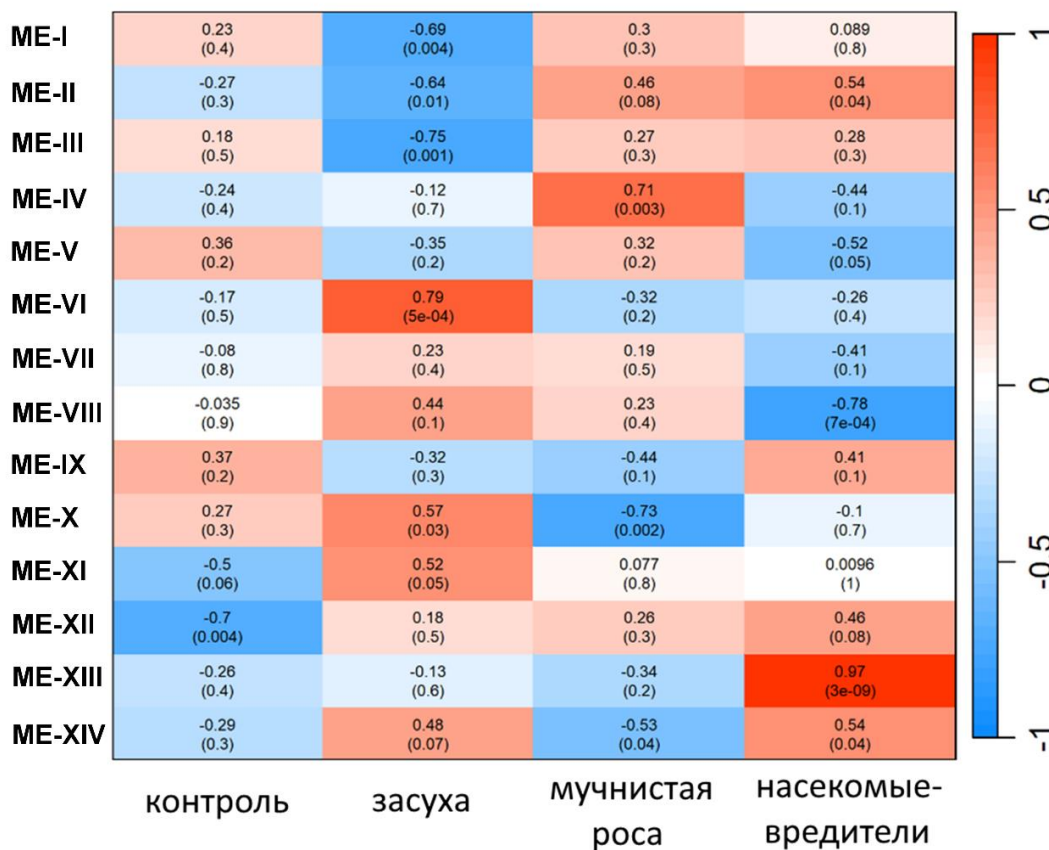


Рис. 4. Тепловая карта взаимосвязи между модулями коэкспрессии и группами у Дуба черешчатого. Каждая ячейка содержит соответствующий показатель корреляции и *p*-value. Красный цвет указывает на положительную корреляцию, а синий – на отрицательную. Знак корреляции также означает положительное или отрицательное направление экспрессии генов в модуле

Для группы засуха в качестве значимых модулей были выбраны ME-VI и ME-III, для заражения мучнистой росой – ME-IV и ME-X, для насекомых-вредителей – ME-XIII и ME-VIII.

Дополнительная проверка достоверности связи признака с модулем коэкспрессии проводилась путем оценки взаимосвязи между принадлежностью к модулю и значимостью гена в шести значимых модулях с использованием пакета WGCNA (рис. 5).

Результаты дополнительной проверки подтвердили обнаруженные ранее связи между признаками и модулями коэкспрессии. Выявленные корреляции указывают на значимую связь между ключевыми элементами в модулях и экспериментальных группах у дуба черешчатого.

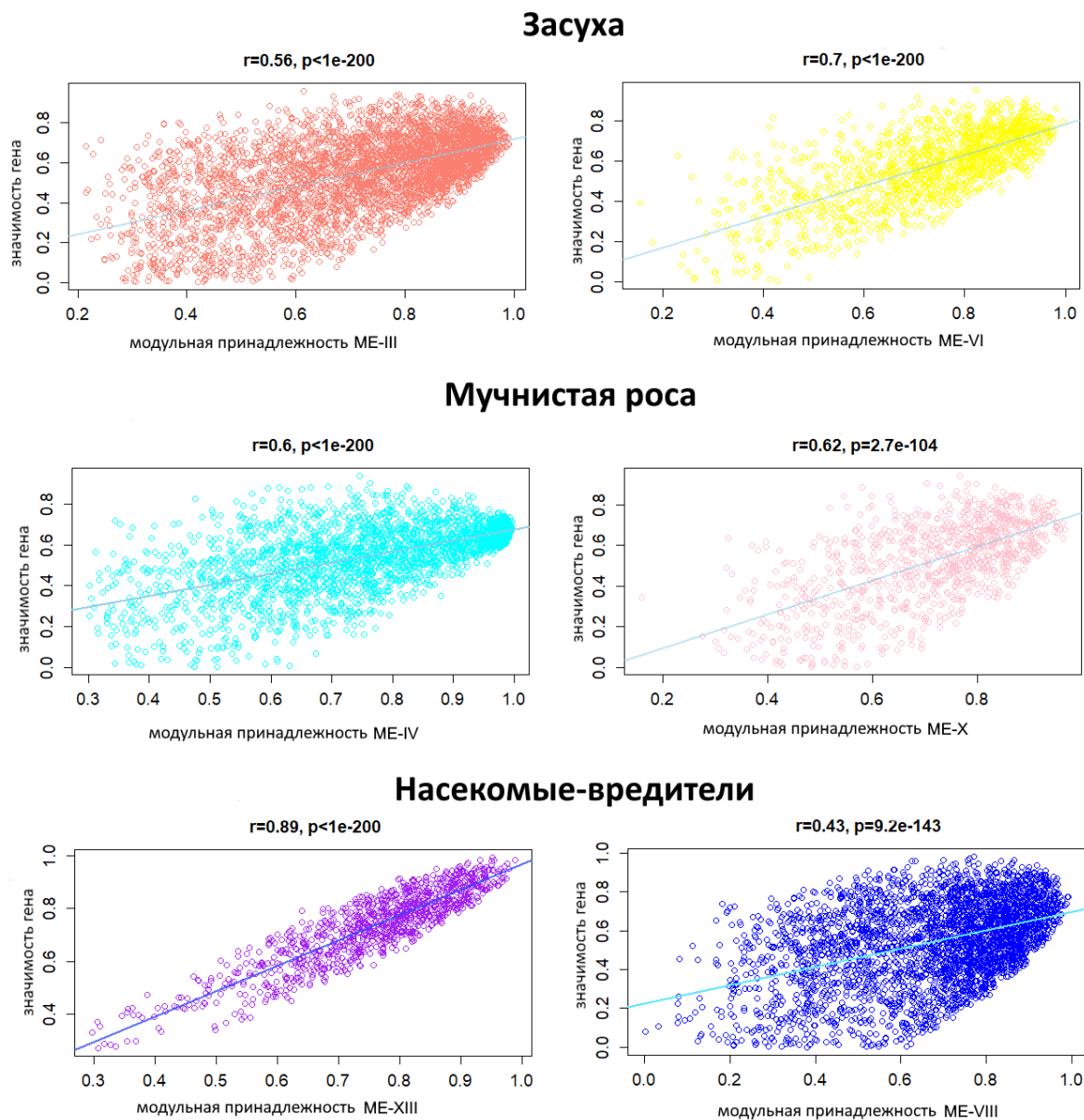


Рис. 5. Взаимосвязь между принадлежностью к модулю и значимостью гена у дуба черешчатого

Анализ обогащения KEGG Pathways в модулях коэкспрессии

Результаты обогащения KEGG для модулей совместной экспрессии генов у дуба черешчатого показаны на рисунке 6.

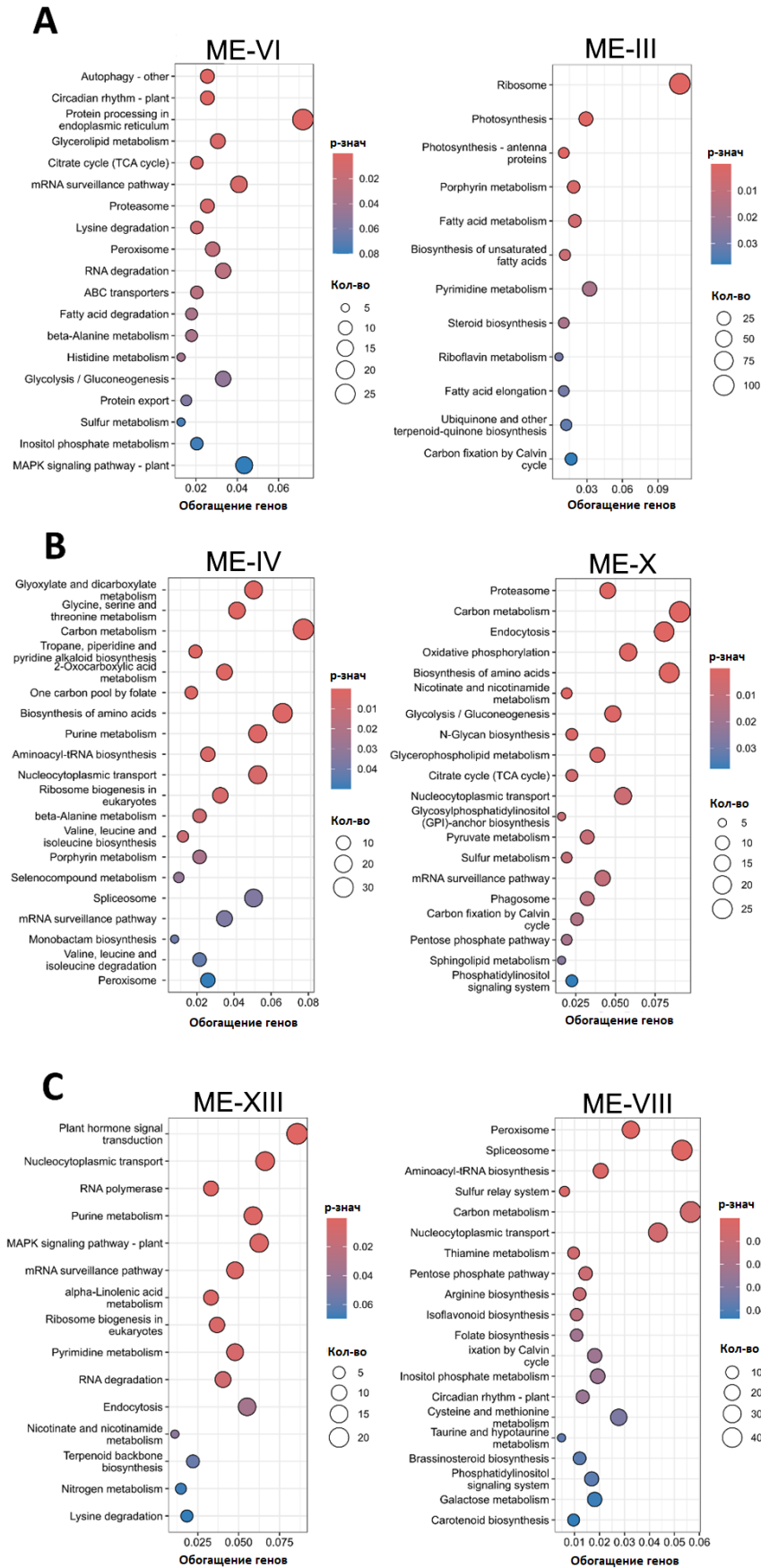


Рис. 6. Обогащение терминами KEGG Pathways в значимых модулях у дуба черешчатого. Слева размещены графики обогащения KEGG для модулей с положительной регуляцией экспрессии, справа с отрицательной. **А** – модули генов, связанных с ответом на засуху, **В** – поражение мучнистой росой, **С** – поражение насекомыми-вредителями. [Открыть в полном размере](#)

Для каждого модуля на графиках изображены 20 наиболее обогащенных метаболических путей KEGG. Общими метаболическими путями для модулей с повышенной регуляцией являются пути, участвующие в контроле экспрессии, МАРК-сигнальных путях и деградации РНК. Модули с пониженной регуляцией во всех трёх группах содержат общие метаболические пути процесса фотосинтеза. Для группы засуха характерна повышенная регуляция путей, связанных с циркадным ритмом, аутофагией и процессингом белка в эндоплазматическом ретикуломе. При заболевании мучнистой росой значимы пути метаболизма глиоксилата и дикарбоксилата, метаболизм аминокислот, биосинтез алкалоидов и метаболизм 2-оксокарбоновых кислот. При стрессе от насекомых-вредителей активны метаболические пути гормональной системы растения, нуклеоплазматический транспорт, метаболизм альфа-линолевой кислоты, биосинтез терпеноидов.

Транскрипционные факторы, регуляторы транскрипции и протеинкиназы в исследуемых модулях коэкспрессии у Дуба черешчатого

В каждом модуле среди 100 генов с наибольшим значением kME были идентифицированы ТФ, регуляторы транскрипции (ТР) и протеинкиназы (ПК). В модуле ME-VI содержалось наибольшее число ТФ и ПК (9 ТФ, 1 ТР и 8 ПК). Распределение ТФ, ТР и ПК в остальных модулях представлено следующим образом: ME-IV – 2 ТФ, 3 ТР, 4 ПК, ME-XIII – 4 ТФ, 3 ТР, 7 ПК, ME-III – 6 ТФ, 3 ТР, 4 ПК), ME-X (7 ТФ, 2 ТР, 3 ПК), ME-VIII – 2 ТР, 5 ПК). Более подробная информация представлена в [таблице S4](#).

Построение генной сети и определение генов-хабов

Для выявления ключевых генов-хабов в значимых модулях было отобрано по 100 генов с наибольшим значением kME в каждом модуле коэкспрессии. С использованием плагина cytoHubba в Cytoscape и метода МСС были построены сети коэкспрессии, что позволило определить гены-хабы (табл. 1).

Таблица 1. Гены-хабы в значимых модулях коэкспрессии генов

Название модуля	ID гена	Описание	Направление экспрессии
ME-III	LOC126688490	GDSL esterase/lipase EXL3-like	пониженная
ME-IV	LOC126718116	Uncharacterized, 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine deaminase-like	повышенная
ME-VI	LOC126720720	NAC 21/22-like transcription factor	повышенная
ME-VIII	LOC126713977	uncharacterized	пониженная
ME-X	LOC126699999	uncharacterized ncRNA	пониженная
ME-XIII	LOC126712690	probable cellulose synthase A catalytic subunit 3	повышенная

ОБСУЖДЕНИЕ

В естественных условиях растения часто подвергаются одновременному воздействию абиотических и биотических стрессов, что приводит к сложным изменениям транскриптома, включая взаимодействия между генами и перекрестную регуляцию защитных путей [1]. Ранее проводились работы по анализу ДЭГ при различных стрессовых условиях у нескольких видов дуба [30–32]. Однако, насколько

нам известно, до этого времени не проводились исследования, которые бы сравнивали экспрессию генов дуба черешчатого при воздействии различных типов стресса.

В ходе метаанализа было выявлено четыре перекрестных гена экспрессирующихся при засушливом стрессе и подавляющихся в других группах. Вне зависимости от направления регуляции эти гены можно рассматривать как вовлечённые в реакцию на биотический и абиотический стрессы. Один из перекрестных генов LOC126694877 является белок-кодирующим геном, содержащим домен DUF1223, структурно относится к суперсемейству тиоредоксинов. Белки семейства тиоредоксинов активно участвуют в антиоксидантной защите растений, регулируя окислительно-восстановительные процессы [33–35]. Тиоредоксины также могут участвовать в регуляции рецепторов абсцизовой кислоты, важных молекул сигнального пути АБК, а также в развитии и функционировании устьиц во время стресса от засухи и засоленности [36, 37]. Второй перекрестный ген LOC126731645 кодирует белок гистона H4 и является одним из четырех гистонов, наряду с H2A, H2B и H3, которые образуют ядро эукариотической нуклеосомы, в том числе, как и гистон H3 он также участвует в сборке нуклеосом [38]. Недавно было опубликовано исследование, в котором описали влияние вариантов гистона H4 у риса на специфические эпигенетические изменения, способствующие устойчивости к осмотическому стрессу [39]. Ген LOC126709605 кодирующий GLAUCE-подобную ацилтрансферазу, и LOC126702476, кодирующий флавонолсинтазу вероятно вовлечены в метаболизм фенилпропаноидов [40, 41] Этот метаболический путь играет важную роль в формировании устойчивости растений к засухе [42–44]. Увеличение экспрессии этих генов в условиях засушливого стресса подтверждает их потенциальную роль в формировании защитного ответа у Дуба черешчатого.

ТФ являются ключевыми регуляторами роста, развития и метаболизма растений посредством активации и подавления различных генов. Они могут участвовать в передаче сигналов стресса, влияя на экспрессию нижестоящих функциональных генов [45, 46]. Сравнительный анализ перекрывающихся ДЭГ при трёх типах стрессовых воздействий показал отсутствие общих ТФ, что указывает на значительные различия в регуляции путей защитных реакций у дуба черешчатого при биотических и абиотических стрессах. При парном анализе перекрывающихся ДЭГ было установлено, что положительная однонаправленная регуляция ТФ присутствовала только в группах, подвергшихся биотическому воздействию. У групп в условиях поражения мучнистой росой и насекомыми-вредителями высоко экспрессировались гены семейства WRKY, AP2/ERF, NAC, MYB и GRAS. Ранее проведенные исследования подтверждают их активное участие в защите растений от патогенов и насекомых-вредителей.

ТФ WRKY могут участвовать в регуляции защитных ответов как на фитопатогены, так и на насекомых-вредителей, в том числе через регуляцию синтеза жасмоновой кислоты, что показано, в частности, у тополя [47, 48], берёзы [49] и яблони [50]. Гены семейства MYB активно вовлечены в ответ на биотические стрессы, регулируя нижестоящие гены в пути метаболизма фенилпропаноидов и участвуя в сигнальных путях жасмоната и абсцизовой кислоты [51–53]. ТФ AP2/ERF [54, 55] регулируют реакцию на биотический стресс через сигнальные пути растительных гормонов, таких как этилен, жасмоновая кислота (JA) и салициловая кислота (SA). ТФ NAC участвуют в регуляции устойчивости к болезням, регулируя гены, кодирующие белки, связанные с патогенезом (PR), передачу сигналов растительных гормонов, реакцию гиперчувствительности и взаимодействие с эффекторами патогенов [56, 57]. Также известно, что некоторые NAC могут взаимодействовать с WRKY, регулируя экспрессию PR генов в ответной реакции на заражение, способствуя устойчивости к патогенам [58, 59]. Белки семейства GRAS представляют собой ключевые ТФ, участвующие в регуляции роста и развития растений, а также в формировании

защитного ответа на биотические и абиотические стрессы через взаимодействие с сигнальными путями гиббереллиновой кислоты [60, 61].

Анализ GO-терминов выявил значительное обогащение категорий, связанных с защитными реакциями, во всех трёх группах у дуба черешчатого. Среди биологических процессов доминировали метаболические реакции и ответы на внешние факторы, тогда как молекулярные функции были представлены регуляцией и связыванием с нуклеиновыми кислотами, а также внутриклеточной транспортной активностью. Несмотря на похожую структуру GO-онтологии у трёх групп, сопоставление с данными о перекрестных TF показывает, что различия между группами проявляются на уровне специфических механизмов регуляции, особенно при сравнении ответа на биотическое и абиотическое воздействие.

Для выявления различий в регуляции генов при засухе, заражении мучнистой росой и повреждении листьев насекомыми был проведён анализ взвешенной сети коэкспрессии генов (WGCNA), в рамках которого для значимых модулей были определены обогащённые пути метаболизма KEGG. Анализ KEGG показал, что модули имели различия в метаболических путях в зависимости от типа стресса. Три наиболее значимыми обогащенными метаболическими путями у модуля ME-VI, коррелирующим с засухой, были аутофагия, циркадный ритм растений и белковый процессинг в эндоплазматическом ретикулуме. Аутофагия при недостатке влаги может активироваться у растений из-за повреждения внутриклеточных структур активными формами кислорода [62]. Белки регуляторы циркадного ритма регулирует реакцию на абиотический стресс у многих растений, посредством взаимодействия с сигнальными путями салициловой кислоты, жасмоновой кислоты и этилена [63]. Эндоплазматический ретикулум участвует в таких важных процессах, как сворачивание белков, их транспорт и посттрансляционные модификации. Наличие обогащённого пути белкового процессинга в эндоплазматическом ретикулуме указывает на активный процесс механизмов адаптивного ответа растения при стрессовых условиях [64–66]. Модуль ME-IV, связанный с ответом на заражение мучнистой росой, обогащен генами, участвующими в метаболизме глиоксилата и карбоксилата, метаболизме аминокислот и углерода. Глиоксилат является ключевым промежуточным продуктом фотодыхательного пути растений, участвующим также в синтезе аминокислот и образующимся совместно с H_2O_2 в реакции, катализируемой гликолат-оксидазой [67, 68]. Ранние исследования подтверждают, что метаболические пути глиоксилата запускаются в ответ на заражение патогенами [69]. Поскольку H_2O_2 является как продуктом глиоксилатного метаболизма, так и важной сигнальной молекулой при заражении фитопатогенами [70, 71], можно предположить, что активация гликолат-оксидазы и связанных с ней реакций глиоксилатного пути способствует регуляции защитных процессов, связанных с продукцией активных форм кислорода. Модуль ME-XIII наиболее всего обогащен генами, связанными с трансдукцией гормональных сигналов. Растительные гормональные сигналы, в том числе MAPK (mitogen-activated protein kinase cascade) играют важную роль в реакции на поедание растений насекомыми, регулируя биосинтез жасмоновой кислоты (JA) и экспрессию связанных с ней защитных генов [72]. Экзогенное применение JA или метилжасмоната (MeJA) повышает устойчивость растений к травоядным вредителям [73]. Наши данные согласуются с результатами предыдущих работ, которые показывают, что при повреждении листьев насекомыми активируются гормональные сигнальные пути жасмоновой кислоты и синтез пуринов, предшественников некоторых алкалоидов [74, 75]. Модули с пониженной экспрессией генов (ME-III, ME-X, ME-VIII) преимущественно включают метаболические пути, связанные с фотосинтезом. Снижение фотосинтетической активности является направленной реакцией растения на комплексную регуляцию физиологических, биохимических и молекулярных процессов

в ответ на повреждение клеточных структур под влиянием биотических и абиотических стрессов [76–78].

Анализ WGCNA позволил выявить гены-хабы ассоциированные со стрессом у дуба черешчатого. Один из таких генов в модуле ME-VI был LOC126720720, являющийся геном семейства ТФ NAC. Интересно, что последовательность выявленного гена хаба не входит в список значимых ДЭГ у группы засуха. Это может быть связано с тем, что значение $\log FC$ этого гена было меньше порогового при анализе ДЭГ, в связи с чем ген был исключен из итогового списка. Получается, что невысокая экспрессия не исключает тот факт, что ген может являться ключевым в сети коэкспрессии.

Кроме того, что NAC участвуют в защите растений от патогенов, и как было описано ранее, эти ТФ также вовлечены в ответ на другие внешние негативные условия окружающей среды, такие как засоленность почвы, засуха и высокие температуры [79]. ТФ NAC участвуют в метаболическом процессе, повышая или понижая регуляцию нижестоящих генов-мишеней и влияя на сигнальные пути фитогормонов [80, 81]. Некоторые гены NAC могут регулироваться через AREB1-2-зависимый механизм, например, у тополя ТФ AREB1-2 связывается с ABRE-мотивами промоторов NAC и инициирует ацетилирование гистонов, усиливая транскрипционную активность и, тем самым повышая устойчивость растения к засухе [82–84].

Выявленный хаб-ген модуля ME-IV, связанного с заражением мучнистой росой, содержит домен Superfamily of metallo-dependent hydrolases и, согласно данным BLAST-анализа, имеет структурное сходство с ферментом 5'-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин деаминазой, впервые описанным у бактерий [85]. Этот фермент катализирует реакцию дезаминирования 5-метилтиоаденозина (МТА), ключевого побочного продукта биосинтеза полиаминов. У растений МТА образуется в процессе синтеза этилена, никотианамина и полиаминов из S-аденозилметионина (SAM) [86]. В метаболизме растений основным ферментом, расщепляющим МТА, считается 5'-метилтиоаденозин-нуклеозидаза (MTN), тогда как участие МТА/SAM-деаминазы в этих реакциях остаётся малоизученным. Накопление МТА может ингибировать активность ферментов, связанных с биосинтезом полиаминов и никотианамина [87], что отражается на росте, развитии и стрессовой устойчивости растений. Полиамины повышают устойчивость растений к стрессам, участвуют в сигнальных путях фитогормонов и иммунном ответе на патогены, проявляя противогрибковую активность [88, 89]. Следует отметить, что упоминания о МТА/SAM-деаминазе у растений крайне редки. Из известных данных сообщалось, что у арахиса данный фермент (ген Aгаip.8ZP6J) демонстрировал повышенную экспрессию при грибковой инфекции, возбудителе поздней пятнистости листьев [90]. Это наблюдение предполагает возможную связь МТА/SAM-деаминазы с полиаминовым метаболизмом и защитными реакциями у древесных растений.

Центральный ген модуля ME-XIII, связанного с повреждением листьев насекомыми, предположительно кодирует субъединицу целлюлозосинтазы А. Целлюлозосинтаза А – это основной фермент, который катализирует синтез β -гликозидной структуры целлюлозы и гемицеллюлозы, составляющую большую часть первичной и вторичной клеточных стенок [91]. Повреждение листьев грызущими насекомыми вызывает увеличение активности генов, вовлеченных в синтез компонентов клеточной стенки растений [92]. В частности, известно, что повреждение листьев, вызванное тлей, провоцирует увеличение содержания целлюлозы и гемицеллюлозы в устойчивых сортах пшеницы уже через три дня после инфицирования [93]. В обзоре указано, что фитогормоны могут влиять на фосфорилирование CesaA направленное на адаптацию растений к стрессовым условиям, а биосинтез целлюлозы в первичной клеточной стенке повышает устойчивость растений к биотическим стрессам из-за возможной реакции на этилен и жасмонат, обеспечивая структурное укрепление тканей при воздействии патогенов или насекомых [94]. Таким образом, гены CesaA, вероятно,

вовлечены в активацию механизмов укрепления клеточной стенки при повреждении листьев. Тем не менее, прямое влияние насекомых на экспрессию CesaA, а также влияние дефицита целлюлозы на устойчивость растений к травоядным остаются слабо изученными и требуют дальнейшего экспериментального подтверждения [95].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выявления ключевых генов устойчивости дуба черешчатого к абиотическим и биотическим стрессам был применен метаанализ и коэкспрессионный сетевой анализ (WGCNA) данных RNA-Seq, полученных при воздействии засухи, мучнистой росы и насекомых-вредителей. Это позволило идентифицировать важные гены, участвующие в общих и уникальных механизмах ответа на разные виды стресса. В результате было обнаружено черыре перекрёстных ДЭГ при воздействии всех стресс-факторов: histone H4, flavonol synthase, acyltransferase GLAUCE-like и неохарактеризованный ген, содержащий домен DUF1223. Результаты анализа РНК-профилей выявлено участие 225 ТФ, из которых 159, ассоциированы с ответом на поедание насекомыми, 24 ТФ, связанных с поражением мучнистой росой и 42 ТФ, участвующих в реакции на засуху у дуба черешчатого. Результаты показывают, что обнаруженные в ходе этой работы ТФ (WRKY, AP2/ERF, NAC, MYB и GRAS) играют важную роль в реакции дуба черешчатого на различные стрессовые воздействия окружающей среды. Анализа коэксперссии позволили выявить 6 модулей, обладающих наибольшей связью с признаком. В результате анализа коэкспрессии было выявлено 6 генов-хабов, из них три автоматически аннотированных NAC, GDSL, CESA3 и оставшиеся не охарактеризованные. Данные о выявленных ТФ, а также о генах-хабах в модулях сетей коэкспрессии будут полезны при проведении исследований в области функциональной геномики, чтобы определить их точную роль в реакции дуба черешчатого на неблагоприятные факторы внешней среды. Кроме того, дальнейшая работа с этими генами может способствовать селекции новых форм дуба черешчатого для их использования в агролесомелиорации и защитном лесоразведении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-26-00545, <https://rscf.ru/project/25-26-00545/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Teshome D.T., Zharare G.E., Naidoo S. The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate. *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. Article No. 601009. doi: [10.3389/fpls.2020.601009](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601009)
2. Toïgo M., Nicolas M., Jonard M., Croisé L., Nageleisen L.M., Jactel H. Temporal trends in tree defoliation and response to multiple biotic and abiotic stresses. *Forest Ecology and Management*. 2020. V. 477. Article No. 118476. doi: [10.1016/j.foreco.2020.118476](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118476)
3. Mitchell R.J., Bellamy P.E., Ellis C.J., Hewison R.L., Hodgetts N.G., Iason G.R., Littlewood N.A., Newey S., Stockan J., Taylor A.F.S. OakEcol: A database of Oak-associated biodiversity within the UK. *Data in Brief*. 2019. V. 25. Article No. 104120. doi: [10.1016/j.dib.2019.104120](https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104120)
4. Mölder A., Meyer P., Nagel R.V. Integrative management to sustain biodiversity and ecological continuity in Central European temperate oak (*Quercus robur*, *Q. petraea*) forests: An overview. *Forest Ecology and Management*. 2019. V. 437. P. 324–339. doi: [10.1016/j.foreco.2019.01.006](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.01.006)
5. Fekete I., Berki I., Lajtha K., Béni Á., Móricz N., Várbíró G., Madarász B., Horváth T., Juhos K., Kotroczó Z. Changes in tree biomass and soil carbon pools of oak ecosystems along a climate gradient in a Central European region. *Plant and Soil*. 2025. P. 1–19. doi: [10.1007/s11104-025-07540-1](https://doi.org/10.1007/s11104-025-07540-1)

6. Rodrigues A.R., Botequim B., Tavares C., Pécurto P., Borges J.G. Addressing soil protection concerns in forest ecosystem management under climate change. *Forest Ecosystems*. 2020. V. 7. No. 1. Article No. 34. doi: [10.1186/s40663-020-00247-y](https://doi.org/10.1186/s40663-020-00247-y)
7. Verheyen K., Gillerot L., Blondeel H., De Frenne P., De Pauw K., Depauw L., Lorier E., Sanczuk P., Schreel J., Vanneste T., Wei L., Landuyt, D. Forest canopies as nature-based solutions to mitigate global change effects on people and nature. *Journal of Ecology*. 2024. V. 112. No. 11. P. 2451–2461. doi: [10.1111/1365-2745.14345](https://doi.org/10.1111/1365-2745.14345)
8. Gribbe S., Enderle L., Weigel R., Hertel D., Leuschner C., Muffler L. Recent growth decline and shifts in climatic growth constraints suggest climate vulnerability of beech, Douglas fir, pine and oak in Northern Germany. *Forest Ecology and Management*. 2024. V. 566. Article No. 122022. doi: [10.1016/j.foreco.2024.122022](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.122022)
9. Barrès B., Dutech C., Saint-Jean G., Bodénès C., Burban C., Fiévet V., Lepoittevin C., Garnier-Géré P., Desprez-Loustau M.L. Demographic and genetic impacts of powdery mildew in a young oak (*Quercus robur* L.) cohort. *Annals of Forest Science*. 2024. V. 81. No. 1. Article No. 44. doi: [10.1186/s13595-024-01259-2](https://doi.org/10.1186/s13595-024-01259-2)
10. Fernández I., Bouffaud M.L., Martínez-Medina A., Schädler M., Tarkka M.T., Weinhold A., van Dam N.M., Herrmann S., Buscot F. Endogenous rhythmic growth and ectomycorrhizal fungi modulate priming of antiherbivore defences in subsequently formed new leaves of oak trees. *Journal of Ecology*. 2025. V. 113. No. 6. P. 1382–1396. doi: [10.1111/1365-2745.14263](https://doi.org/10.1111/1365-2745.14263)
11. Le Provost G., Brachi B., Lesur I., Lalanne C., Labadie K., Aury J.M., Silva C., Postolache D., Leroy T., Plomion C. Gene expression and genetic divergence in oak species highlight adaptive genes to soil water constraints. *Plant Physiology*. 2022. V. 190. No. 4. P. 2466–2483. doi: [10.1093/plphys/kiac420](https://doi.org/10.1093/plphys/kiac420)
12. Tikhomirova T.S., Krutovsky K.V., Shestibratov K.A. Molecular Traits for Adaptation to Drought and Salt Stress in Birch, Oak and Poplar Species. *Forests*. 2023. V. 14. No. 1. Article No. 7. doi: [10.3390/f14010007](https://doi.org/10.3390/f14010007)
13. Zybinskaya P.A., Tretyakova A.V., Krylov P.A. Spectral Evaluation of the Vital State of *Quercus Robur* L. Under Simulated Drought Conditions. *Scientific Visualization*. 2025. V. 17. No.1. doi: [10.26583/sv.17.1.04](https://doi.org/10.26583/sv.17.1.04)
14. Krutovsky K.V., Popova A.A., Yakovlev I.A., Yanbaev Y.A., Matveev S.M. Response of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) to Adverse Environmental Conditions in Genetic and Dendrochronological Studies. *Plants (Basel)*. 2025. V. 14. No. 1. Article No. 109. doi: [10.3390/plants14010109](https://doi.org/10.3390/plants14010109)
15. Gailing O., Hipp A.L., Plomion C., Carlson J.E. Oak Population Genomics. 2021. In: *Population Genomics*. Springer, Cham. doi: [10.1007/13836_2021_100](https://doi.org/10.1007/13836_2021_100)
16. Kersten B., Ghirardo A., Schnitzler J.P., Kanawati B., Schmitt-Kopplin P., Fladung M., Schroeder H. Integrated transcriptomics and metabolomics decipher differences in the resistance of pedunculate oak to the herbivore *Tortrix viridana* L. *BMC Genomics*. 2013. V. 14. No. 1. Article No. 737. doi: [10.1186/1471-2164-14-737](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-737)
17. Sanchez-Lucas R., Bosanquet J.L., Henderson J., Catoni M., Pastor V., Luna E. Elicitor specific mechanisms of defence priming in oak seedlings against powdery mildew. *Plant, Cell & Environment*. 2025. V. 48. No. 6. P. 4455–4474. doi: [10.1111/pce.1549](https://doi.org/10.1111/pce.1549)
18. Madritsch S., Wischnitzki E., Kotrade P., Ashoub A., Burg A., Fluch S., Brüggemann W., Sehr E.M. Elucidating drought stress tolerance in European oaks through cross-species transcriptomics. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2019. V. 9. No. 10. P. 3181–3199. doi: [10.1534/g3.119.400456](https://doi.org/10.1534/g3.119.400456)
19. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*. 2019. V. 37. P. 907–915. doi: [10.1038/s41587-019-0201-4](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4)
20. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2018. V. 34. No. 18. P. 3094–3100. doi: [10.1093/bioinformatics/bty191](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191)

21. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014. V. 30. No. 7. P. 923–930. doi: [10.1093/bioinformatics/btt656](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656)
22. Chen Y., Chen L., Lun A.T., Baldoni P.L., Smyth G.K. edgeR v4: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for small counts and larger datasets. *Nucleic Acids Research*. 2025. V. 53. No. 2. Article No. gkaf018. doi: [10.1093/nar/gkaf018](https://doi.org/10.1093/nar/gkaf018)
23. Zheng Y., Jiao C., Sun H., Rosli H.G., Pombo M.A., Zhang P., Banf M., Dai X., Martin B.G., Giovannoni J.J., et al. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Molecular Plant*. 2016. V. 9. No. 12. P. 1667–1670. doi: [10.1016/j.molp.2016.09.014](https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.014)
24. Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. V. 38. No. 12. P. 5825–5829. doi: [10.1093/molbev/msab293](https://doi.org/10.1093/molbev/msab293)
25. Huerta-Cepas J., Szklarczyk D., Heller D., Hernández-Plaza A., Forslund S.K., Cook H., Mende D.R., Letunic I., Rattei T., Bork P. et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47. No. D1. P. D309–D314. doi: [10.1093/nar/gky1085](https://doi.org/10.1093/nar/gky1085)
26. Langfelder P., Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008. V. 9. P. 1–13. doi: [10.1186/1471-2105-9-559](https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559)
27. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003. V. 13. No. 11. P. 2498–2504. doi: [10.1101/gr.1239303](https://doi.org/10.1101/gr.1239303)
28. Chin C.H., Chen S.H., Wu H.H., Ho C.W., Ko M.T., Lin C.Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*. 2014. V. 8. Article No. S11. doi: [10.1186/1752-0509-8-S4-S11](https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11)
29. Rau A., Marot G., Jaffrézic F. Differential meta-analysis of RNA-seq data from multiple studies. *BMC Bioinformatics*. 2014. V. 15. No. 1. Article No. 91. doi: [10.1186/1471-2105-15-91](https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-91)
30. Gugger P.F., Peñalosa-Ramírez J.M., Wright J.W., Sork V.L. Whole-transcriptome response to water stress in a California endemic oak, *Quercus lobata*. *Tree Physiology*. 2017. V. 37. No. 5. P. 632–644. doi: [10.1093/treephys/tpw122](https://doi.org/10.1093/treephys/tpw122)
31. Magalhães A.P., Verde N., Reis F., Martins I., Costa D., Lino-Neto T., Castro P.H., Tavares R.M., Azevedo H. RNA-Seq and gene network analysis uncover activation of an ABA-dependent signalosome during the cork oak root response to drought. *Frontiers in Plant Science*. 2016. V. 6. Article No. 1195. doi: [10.3389/fpls.2015.01195](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01195)
32. Maboreke H.R., Feldhahn L., Bönn M., Tarkka M.T., Buscot F., Herrmann S., Menzel R., Ruess L. Transcriptome analysis in oak uncovers a strong impact of endogenous rhythmic growth on the interaction with plant-parasitic nematodes. *BMC Genomics*. 2016. V. 17. No. 1. Article No. 627. doi: [10.1186/s12864-016-2992-8](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2992-8)
33. Sevilla F., Camejo D., Ortiz-Espín A., Calderón A., Lázaro J.J., Jiménez A. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*. 2015. V. 66. No. 10. P. 2945–2955. doi: [10.1093/jxb/erv146](https://doi.org/10.1093/jxb/erv146)
34. Kumari P., Gupta A., Yadav S. Thioredoxins as molecular players in plants, pests, and pathogens. In: *Plant-Pest Interactions: From Molecular Mechanisms to Chemical Ecology: Chemical Ecology*. Singapore: Springer Singapore, 2021. P 107–125. doi: [10.1007/978-981-15-2467-7_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2467-7_6)

35. Sevilla F., Martí M.C., De Brasi-Velasco S., Jiménez A. Redox regulation, thioredoxins, and glutaredoxins in retrograde signalling and gene transcription. *Journal of Experimental Botany*. 2023. V. 74. No. 19. P. 5955–5969. doi: [10.1093/jxb/erad270](https://doi.org/10.1093/jxb/erad270)
36. De Brasi-Velasco S., Sánchez-Guerrero A., Castillo M.C., Vertommen D., León J., Sevilla F., Jiménez A. Thioredoxin TRXo1 is involved in ABA perception via PYR1 redox regulation. *Redox Biology*. 2023. V. 63. Article No. 102750. doi: [10.1016/j.redox.2023.102750](https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102750)
37. Sánchez-Guerrero A., Nadal M., Florez-Sarasa I., Ribas-Carbó M., Vallarino J.G., Brasi-Velasco S.D., Fernie A.R., Flexas J., Jiménez A., Sevilla F. Decreased levels of thioredoxin o1 influences stomatal development and aperture but not photosynthesis under non-stress and saline conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. No. 3. Article No. 1063. doi: [10.3390/ijms22031063](https://doi.org/10.3390/ijms22031063)
38. Talbert P.B., Henikoff S. Histone variants at a glance. *Journal of Cell Science*. 2021. V. 134. No. 6. Article No. jcs244749. doi: [10.1242/jcs.244749](https://doi.org/10.1242/jcs.244749)
39. Gandhivel V.H.S., Sotelo-Parrilla P., Raju S., Jha S., Gireesh A., Harshith C.Y., Gut F., Vinothkumar K.R., Berger F., Jeyaprakash A.A., Shivaprasad P.V. An *Oryza*-specific histone H4 variant predisposes H4 lysine 5 acetylation to modulate salt stress responses. *Nature Plants*. 2025. V. 11. No. 4. P. 790–807. doi: [10.1038/s41477-025-01974-2](https://doi.org/10.1038/s41477-025-01974-2)
40. Liao H., Wu F., Xie J., He W., Zhang X., Dai J., Liu H., Li M., Wang L. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis elucidates transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in differentially pigmented honeysuckle (*Lonicera japonica*) varieties. *Frontiers in Plant Science*. 2025. V. 16. Article No. 1636028. doi: [10.3389/fpls.2025.1636028](https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1636028)
41. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. No. 23. Article No. 12824. doi: [10.3390/ijms222312824](https://doi.org/10.3390/ijms222312824)
42. Aluko O.O., Ninkuu V., Jianpei Y., Chen S., Zeng H., Dakurah F.D. Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*. 2025. V. 16. Article No. 1571825. doi: [10.3389/fpls.2025.1571825](https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1571825)
43. Rao M.J., Zheng B. The role of polyphenols in abiotic stress tolerance and their antioxidant properties to scavenge reactive oxygen species and free radicals. *Antioxidants*. 2025. V. 14. No. 1. Article No. 74. doi: [10.3390/antiox14010074](https://doi.org/10.3390/antiox14010074)
44. Chen G., Li D., Yao P., Chen F., Yuan J., Ma B., Yang Z., Ding B., He N. Metabolic and transcriptional analysis reveals flavonoid involvement in the drought stress response of mulberry leaves. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. V. 25. No. 13. Article No. 7417. doi: [10.3390/ijms25137417](https://doi.org/10.3390/ijms25137417)
45. Hrmova M., Hussain S.S. Plant transcription factors involved in drought and associated stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. No. 11. Article No. 5662. doi: [10.3390/ijms22115662](https://doi.org/10.3390/ijms22115662)
46. Thilakarathne A.S., Liu F., Zou Z. Plant signaling hormones and transcription factors: key regulators of plant responses to growth, development, and stress. *Plants*. 2025. V. 14. No. 7. Article No. 1070. doi: [10.3390/plants14071070](https://doi.org/10.3390/plants14071070)
47. Müller N.A., Kersten B., Fladung M., Schroeder H. RNA-seq of eight different poplar clones reveals conserved up-regulation of gene expression in response to insect herbivory. *BMC Genomics*. 2019. V. 20. No. 1. Article No. 673. doi: [10.1186/s12864-019-6048-8](https://doi.org/10.1186/s12864-019-6048-8)
48. Zhao H., Jiang J., Li K., Liu G. *Populus simonii* × *Populus nigra* WRKY70 is involved in salt stress and leaf blight disease responses. *Tree Physiology*. 2017. V. 37. No. 6. P. 827–844. doi: [10.1093/treephys/tpx020](https://doi.org/10.1093/treephys/tpx020)
49. Xie Q., Dong W., Wang M., Wang J., Sun L., Liu Z., Gao C., Cao C. BpWRKY6 regulates insect resistance by affecting jasmonic acid and terpenoid synthesis in *Betula*

- platyphylla. *Plant Biotechnology Journal*. 2025. V. 23. No. 9. P. 3682–3696. doi: [10.1111/pbi.70169](https://doi.org/10.1111/pbi.70169)
50. Lan L., Cao L., Zhang L., Fu W., Luo C., Wu C., Zeng X., Qu S., Yu X., Deng W., et al. A novel mode of WRKY1 regulating PR1-mediated immune balance to defend against powdery mildew in apple. *Molecular Horticulture*. 2025. V. 5. No. 1. Article No. 17. doi: [10.1186/s43897-024-00141-z](https://doi.org/10.1186/s43897-024-00141-z)
 51. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2013. V. 19. No. 3. P. 307–321. doi: [10.1007/s12298-013-0179-1](https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1)
 52. Tian X., Zhang L., Feng S., Zhao Z., Wang X., Gao H. Transcriptome analysis of apple leaves in response to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. V. 20. No. 9. Article No. 2326. doi: [10.3390/ijms20092326](https://doi.org/10.3390/ijms20092326)
 53. Chezem W.R., Memon A., Li F.S., Weng J.K., Clay N.K. SG2-type R2R3-MYB transcription factor MYB15 controls defense-induced lignification and basal immunity in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2017. V. 29. No. 8. P. 1907–1926. doi: [10.1105/tpc.16.00954](https://doi.org/10.1105/tpc.16.00954)
 54. Su Z.L., Li A.M., Wang M., Qin C.X., Pan Y.Q., Liao F., Chen Z., Zhang B., Cai W., Huang D.L. The role of AP2/ERF transcription factors in plant responses to biotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025. V. 26. No. 10. Article No. 4921. doi: [10.3390/ijms26104921](https://doi.org/10.3390/ijms26104921)
 55. Reboledo G., Agorio A., Vignale L., Alvarez A., Ponce De León I. The moss-specific transcription factor PpERF24 positively modulates immunity against fungal pathogens in *Physcomitrium patens*. *Frontiers in Plant Science*. 2022. V. 13. Article No. 908682. doi: [10.3389/fpls.2022.908682](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.908682)
 56. Vranic M., Perochon A., Benbow H., Doohan F.M. Comprehensive analysis of pathogen-responsive wheat NAC transcription factors: new candidates for crop improvement. *G3*. 2022. V. 12. No. 11. Article No. jkac247. doi: [10.1093/g3journal/jkac247](https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac247)
 57. Dong B., Liu Y., Huang G., Song A., Chen S., Jiang J., Chen F., Fang W. Plant NAC transcription factors in the battle against pathogens. *BMC Plant Biology*. 2024. V. 24. No. 1. Article No. 958. doi: [10.1186/s12870-024-05636-x](https://doi.org/10.1186/s12870-024-05636-x)
 58. Welner D.H., Lindemose S., Grossmann J.G., Møllegaard N.E., Olsen A.N., Helgstrand C., Skriver K., Lo Leggio L. DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *Biochemical Journal*. 2012. V. 444. No. 3. P. 395–404. doi: [10.1042/BJ20111742](https://doi.org/10.1042/BJ20111742)
 59. Shan W.E.I., Chen J.Y., Kuang J.F., Lu W.J. Banana fruit NAC transcription factor MaNAC5 cooperates with MaWRKYs to enhance the expression of pathogenesis-related genes against *Colletotrichum musae*. *Molecular Plant Pathology*. 2016. V. 17. No. 3. P. 330–338. doi: [10.1111/mpp.12281](https://doi.org/10.1111/mpp.12281)
 60. Khan Y., Xiong Z., Zhang H., Liu S., Yaseen T., Hui T. Expression and roles of GRAS gene family in plant growth, signal transduction, biotic and abiotic stress resistance and symbiosis formation—a review. *Plant Biology*. 2022. V. 24. No. 3. P. 404–416. doi: [10.1111/plb.13364](https://doi.org/10.1111/plb.13364)
 61. Guan Y., Wang K., Zhao J., Miao X., Li X., Song P., Hu H., Zhang S., Li C. Genome-wide identification of TaeGRASs responsive to biotic stresses and functional analysis of TaeSCL6 in wheat resistance to powdery mildew. *BMC Genomics*. 2024. V. 25. No. 1. Article No. 1149. doi: [10.1186/s12864-024-11041-3](https://doi.org/10.1186/s12864-024-11041-3)
 62. Bao Y. Links between drought stress and autophagy in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2020. V. 15. No. 8. Article No. 1779487. doi: [10.1080/15592324.2020.1779487](https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1779487)

63. Dong Y., Gupta S., Wargent J.J., Putterill J., Macknight R.C., Gechev T.S., Mueller-Roeber B., Dijkwel P.P. Comparative transcriptomics of multi-stress responses in *Pachycladon cheesemanii* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. No. 14. Article No. 11323. doi: [10.3390/ijms241411323](https://doi.org/10.3390/ijms241411323)
64. Duan Z., Chen K., Yang T., You R., Chen B., Li J., Liu L. Mechanisms of endoplasmic reticulum protein homeostasis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. No. 24. Article No. 17599. doi: [10.3390/ijms242417599](https://doi.org/10.3390/ijms242417599)
65. Liu J.X., Howell S.H. Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytologist*. 2016. V. 211. No. 2. P. 418–428. doi: [10.1111/nph.13915](https://doi.org/10.1111/nph.13915)
66. Dai Vu L., Gevaert K., De Smet I. Protein language: post-translational modifications talking to each other. *Trends in Plant Science*. 2018. V. 23. No. 12. P. 1068–1080. doi: [10.1016/j.tplants.2018.09.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.004)
67. Shafiq M., Sadiq S., Ali Q., Haider M.S., Habib U., Ali D., Shahid M.A. Identification and characterization of Glycolate oxidase gene family in garden lettuce (*Lactuca sativa* cv. 'Salinas') and its response under various biotic, abiotic, and developmental stresses. *Scientific Reports*. 2023. V. 13. No. 1. Article No. 19686. doi: [10.1038/s41598-023-47180-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-47180-y)
68. Czarnocka W., Karpiński S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. V. 122. P. 4–20. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011)
69. Ibe C.N., Bailey S.L., Korolev A.V., Brett P., Saunders D.G. Isocitrate lyase promotes *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* susceptibility in wheat (*Triticum aestivum*) by suppressing accumulation of glyoxylate cycle intermediates. *The Plant Journal*. 2024. V. 119. No. 4. P. 2033–2044. doi: [10.1111/tbj.16908](https://doi.org/10.1111/tbj.16908)
70. Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Tzin V., Mysore K.S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*. 2014. V. 5. Article No. 17. doi: [10.3389/fpls.2014.00017](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017)
71. Zhang P., Li J., Gou X., Zhu L., Yang Y., Li Y., Zhang Y., Ding L., Ansabayeva A., Meng Y., Shan W. The *Phytophthora infestans* effector Pi05910 suppresses and destabilizes host glycolate oxidase StGOX4 to promote plant susceptibility. *Molecular Plant Pathology*. 2024. V. 25. No. 11. Article No. e70021. doi: [10.1111/mps.70021](https://doi.org/10.1111/mps.70021)
72. Hettenhausen C., Schuman M.C., Wu J. MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect Science*. 2015. V. 22. No. 2. P. 157–164. doi: [10.1111/1744-7917.12128](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12128)
73. Widemann E., Miesch L., Lugan R., Holder E., Heinrich C., Aubert Y., Miesch M., Pinot F., Heitz T. The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. V. 288. No. 44. P. 31701–31714. doi: [10.1074/jbc.M113.499228](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499228)
74. Pastierovič F., Mogilicherla K., Hradecký J., Kalyniukova A., Dvořák O., Roy A., Tomášková I. Genome-wide transcriptomic and metabolomic analyses unveiling the defence mechanisms of *Populus tremula* against sucking and chewing insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. V. 25. No. 11. Article No. 6124. doi: [10.3390/ijms25116124](https://doi.org/10.3390/ijms25116124)
75. Zhao Y., Sun T., Liu J., Zhang R., Yu Y., Zhou G., Liu J., Gao B. The key role of plant hormone signaling transduction and flavonoid biosynthesis pathways in the response of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) to feeding stimulation by pine caterpillar (*Dendrolimus tabulaeformis*). *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. V. 25. No. 12. Article No. 6354. doi: [10.3390/ijms25126354](https://doi.org/10.3390/ijms25126354)

76. Zhou S., Lou Y.R., Tzin V., Jander G. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiology*. 2015. V. 169. No. 3. P. 1488–1498. doi: [10.1104/pp.15.01405](https://doi.org/10.1104/pp.15.01405)
77. Ferreira M.A., Teixeira R.M., Brustolini O.J., Saia T.F., Jean-Baptiste J., Ribeiro N.G., Breves S.S., Sampaio F.R., Santos E.G., Leon B.A. et al. The immune NIK1/RPL10/LIMYB signaling module regulates photosynthesis and translation under biotic and abiotic stresses. *Nature Communications*. 2025. V. 16. No. 1. Article No. 4433. doi: [10.1038/s41467-025-59571-y](https://doi.org/10.1038/s41467-025-59571-y)
78. Sanchez-Lucas R., Mayoral C., Raw M., Mousouraki M.A., Luna E. Elevated CO₂ alters photosynthesis, growth and susceptibility to powdery mildew of oak seedlings. *Biochemical Journal*. 2023. V. 480. No. 17. P. 1429–1443. doi: [10.1042/BCJ20230002](https://doi.org/10.1042/BCJ20230002)
79. Diao P., Chen C., Zhang Y., Meng Q., Lv W., Ma N. The role of NAC transcription factor in plant cold response. *Plant Signaling & Behavior*. 2020. V. 15. No. 9. Article No. 1785668. doi: [10.1080/15592324.2020.1785668](https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1785668)
80. Ma J., Yuan M., Sun B., Zhang D., Zhang J., Li C., Shao Y., Liu W., Jiang L. Evolutionary divergence and biased expression of NAC transcription factors in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*. 2021. V. 10. No. 2. Article No. 382. doi: [10.3390/plants10020382](https://doi.org/10.3390/plants10020382)
81. Guo F., Liu S., Zhang C., Dong T., Meng X., Zhu M. Genome-wide systematic survey and analysis of NAC transcription factor family and their response to abiotic stress in sweetpotato. *Scientia Horticulturae*. 2022. V. 299. Article No. 111048. doi: [10.1016/j.scienta.2022.111048](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111048)
82. Estravis-Barcala M., Mattera M. G., Soliani C., Bellora N., Opgenoorth L., Heer K., Arana M.V. Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*. 2020. V. 71. No. 13. P. 3765–3779. doi: [10.1093/jxb/erz532](https://doi.org/10.1093/jxb/erz532)
83. Duan M., Zhang R., Zhu F., Zhang Z., Gou L., Wen J., Dong J., Wang T. A lipid-anchored NAC transcription factor is translocated into the nucleus and activates glyoxalase I expression during drought stress. *The Plant Cell*. 2017. V. 29. No. 7. P. 1748–1772. doi: [10.1105/tpc.17.00044](https://doi.org/10.1105/tpc.17.00044)
84. Chen Y., Xia P. NAC transcription factors as biological macromolecules responded to abiotic stress: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025. V. 308. Article No. 142400. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2025.142400](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142400)
85. Hermann J.C., Marti-Arbona R., Fedorov A.A., Fedorov E., Almo S.C., Shoichet B.K., Raushel F. M. Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature*. 2007. V. 448. No. 7155. P. 775–779. doi: [10.1038/nature05981](https://doi.org/10.1038/nature05981)
86. Zierer W., Hajirezaei M.R., Eggert K., Sauer N., von Wirén N., Pommerrenig B. Phloem-specific methionine recycling fuels polyamine biosynthesis in a sulfur-dependent manner and promotes flower and seed development. *Plant Physiology*. 2016. V. 170. No. 2. P. 790–806. doi: [10.1104/pp.15.00786](https://doi.org/10.1104/pp.15.00786)
87. Waduwara-Jayabahu I., Oppermann Y., Wirtz M., Hull Z.T., Schoor S., Plotnikov A.N., Hell R., Sauter M., Moffat B.F., Moffat B.A. Recycling of methylthioadenosine is essential for normal vascular development and reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2012. V. 158. No. 4. P. 1728–1744. doi: [10.1104/pp.111.191072](https://doi.org/10.1104/pp.111.191072)
88. Seo S.Y., Kim Y.J., Park K.Y. Increasing polyamine contents enhances the stress tolerance via reinforcement of antioxidative properties. *Frontiers in Plant Science*. 2019. V. 10. Article No. 1331. doi: [10.3389/fpls.2019.01331](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01331)
89. Yi Q., Park M.J., Vo K.T.X., Jeon J.S. Polyamines in plant–pathogen interactions: roles in defense mechanisms and pathogenicity with applications in fungicide development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. V. 25. No. 20. Article No. 10927. doi: [10.3390/ijms252010927](https://doi.org/10.3390/ijms252010927)

90. Gangurde S.S., Nayak S.N., Joshi P., Purohit S., Sudini H.K., Chitikineni A., Hong Y., Guo D., Chen X., Varshney R.K. Comparative transcriptome analysis identified candidate genes for late leaf spot resistance and cause of defoliation in groundnut. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. No. 9. Article No. 4491. doi: [10.3390/ijms22094491](https://doi.org/10.3390/ijms22094491)
91. Yin Y., Huang J., Xu Y. The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae. *BMC Plant Biology*. 2009. V. 9. No. 1. Article No. 99. doi: [10.1186/1471-2229-9-99](https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-99)
92. Amoroso C.G., D'Esposito D., Aiese Cigliano R., Ercolano M.R. Comparison of tomato transcriptomic profiles reveals overlapping patterns in abiotic and biotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. No. 4. Article No. 4061. doi: [10.3390/ijms24044061](https://doi.org/10.3390/ijms24044061)
93. Mafa M.S., Rufetu E., Alexander O., Kemp G., Mohase L. Cell-wall structural carbohydrates reinforcements are part of the defence mechanisms of wheat against Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) infestation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2022. V. 179. P. 168–178. doi: [10.1016/j.plaphy.2022.03.018](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.018)
94. Li W., Wei J., Lei Y., Yang Z., Zhang S., Feng J., Li Y., Liu Y., Sheng H. Phosphorylation of cellulose synthases in plant responses to environmental changes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Article No. 139313. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2024.139313](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139313)
95. Perez-Alonso M.M., Talavera-Mateo L., Ojeda-Martinez D., Barcenilla-Valcárcel L., Montesinos Á., Garcia A., Frey C., Boter M., Martinez M., Diaz I., Santamaria M.E. The role of plant cell walls in pest resistance: current insights and future perspectives. *Journal of Experimental Botany*. 2025. Article No. eraf306. doi: [10.1093/jxb/eraf306](https://doi.org/10.1093/jxb/eraf306)

Рукопись поступила в редакцию 19.02.2026, переработанный вариант поступил 12.03.2026.
Дата опубликования 28.03.2026.

===== BIOINFORMATICS =====

Meta-Analysis of Transcriptome Profiles of English Oak (*Quercus robur* L.) In Response to Abiotic and Biotic Stresses

Vishnyakov S.A., Oleynikov A.A., Krylov P.A.

FSC of Agroecology RAS, Volgograd, Russia

Abstract. Under natural conditions, plants are exposed to a complex set of adverse environmental factors that alter their RNA expression profiles. To date, RNA-Seq studies in *Quercus robur* L. have typically examined responses to individual stressors, and no meta-analysis integrating multiple conditions has been performed. Therefore, the aim of our study was to conduct a meta-analysis of RNA-Seq gene expression datasets associated with drought, powdery mildew infection, and insect herbivory in order to identify differentially expressed genes (DEGs), including transcription factors (TFs). We identified four overlapping DEGs responsive to all

examined stressors: histone H4, flavonol synthase, acyltransferase GLAUCE-like, and an uncharacterized gene containing a DUF1223 domain. Analysis of transcription factor profiles using the iTAK v1.6 revealed 225 TFs in total, of which 159 were associated with insect feeding, 24 with powdery mildew infection, and 42 with drought stress. Four TFs were jointly downregulated under drought and insect herbivory. Under stress caused by powdery mildew and insects, nine TFs showed altered expression, including three WRKY genes and one representative each from the AP2/ERF, NAC, MYB, and GRAS families, while the remaining two belonged to the MYB-related family. No overlap in TF expression was observed between drought stress and powdery mildew. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) identified 14 modules, six of which showed the strongest association with the examined traits and were selected for hub-genes detection. In total, six hub genes were identified; three of them were automatically annotated as NAC, GDSL, and CESA3, while the remaining genes remained uncharacterized. Overall, the meta-analysis demonstrates that plant responses to diverse stressors are mediated by both stress-specific and shared molecular mechanisms. Co-expression modules and transcription factors play a central role in these responses, enabling the identification of promising candidate genes for future functional studies and breeding efforts English oak.

Key words: *meta-analysis, RNA-seq, WGCNA, English oak (Quercus robur), drought, powdery mildew, insect herbivory*