

ГЕНЫ ЦИСТЕИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ПЫРЕЯ *Thinopyrum elongatum*¹© 2024 М. П. Слезина¹, Е. А. Истомина¹, А. Н. Шиян¹, Т. И. Одинцова¹, *¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024 г.

После доработки 03.06.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Цистеин-богатые пептиды играют важную роль в защитной системе растений. Цель настоящей работы состояла в поиске *in silico* генов антимикробных и сигнальных пептидов в геноме пырея удлиненного *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey ($2n = 14$, EE) – дикорастущего злака, обладающего высокой устойчивостью к патогенам и абиотическому стрессу. В результате биоинформатического анализа в геноме пырея было выявлено 154 новых гена предшественников антимикробных и сигнальных пептидов, относящихся к девяти семействам. В ряде генов цистеин-богатых пептидов обнаружены интроны. Были определены структура предшественников пептидов и локализация генов пептидов в хромосомах пырея. Показано наибольшее сходство последовательностей пептидов пырея с гомологичными пептидами растений родов *Triticum* и *Aegilops*, что подтверждает цитогенетические данные о родстве генома E с геномом D и близкими ему геномами. Полученные результаты вносят вклад в характеристику молекулярных компонентов иммунной системы *Th. elongatum* и послужат базой для дальнейшего исследования механизмов устойчивости, а также для научно обоснованного практического использования этого вида в качестве донора устойчивости в селекции пшеницы.

Ключевые слова: иммунитет растений, *Thinopyrum elongatum*, цистеин-богатые пептиды, биоразнообразие генов.

DOI: 10.31857/S0016675824100055 EDN: WFJMCC

В ходе эволюции растения выработали сложную систему защиты от патогенов, которая осуществляется на двух уровнях [1]. Первый базовый уровень защиты, получивший название РТИ (РАМР-triggered immunity), активируется при узнавании расположенными в мембране рецепторами растительной клетки эволюционно консервативных структур патогена, так называемых РАМР (Pathogen-Associated Molecular Patterns) или МАМР (Microbe-Associated Molecular Patterns), либо компонентов растительной клетки, названных ДАМР (Damage-Associated Molecular Patterns), которые высвободились при ее разрушении патогенными микроорганизмами. РТИ эффективно защищает от неспециализированных патогенов. Следующий уровень защиты активируется после узнавания внутриклеточными рецепторами клетки, кодируемыми генами устойчивости, факторов вирулентности (эффекторов) патогена. Узнавание эффекторов индуцирует защитный ответ, получивший название ЕТИ (effector-triggered

immunity). В отличие от РТИ, ЕТИ направлен на борьбу со специализированными патогенами. Узнавание патогена при РТИ и ЕТИ приводит к сходным процессам, таким как быстрое поступление ионов кальция в клетку, синтез активных форм кислорода, активация митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), перепрограммирование экспрессии генов, отложение каллозы в клеточной стенке в местах инфицирования, а также синтез антимикробных соединений. Среди антимикробных соединений, образующихся в ответ на заражение, существенная роль принадлежит защитным пептидам.

Важнейшую группу защитных пептидов составляют антимикробные пептиды (АМП), которые непосредственно взаимодействуют с патогенами и подавляют их рост. Они обеспечивают защиту против широкого круга патогенов [2–4]. Эффективность защиты обеспечивается чрезвычайным разнообразием компонентного состава АМП в пределах одного вида растений, а также многообразием их механизмов действия. Кроме того, АМП взаимодействуют с другими компонентами врожденной иммунной системы растений [5, 6].

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.

Помимо АМП, к группе защитных пептидов относятся регуляторные пептиды: являясь участниками сигнальных путей, они координируют взаимодействия растений с патогенными и непатогенными микроорганизмами, а также стрессовыми абиотическими факторами среды [7–10]. На основе особенностей строения пептиды растений условно подразделяют на три основные группы: цистеин-богатые пептиды; пептиды, не содержащие остатков цистеина, и пептиды с посттрансляционными модификациями [11]. Цистеин-богатые пептиды (ЦБП) образуют наиболее многочисленную группу, на их долю приходится около 2% от всех экспрессирующихся генов [12, 13]. Гены ЦБП обычно образуют кластеры на хромосомах, которые возникли в результате многократных дупликаций отдельных генов. При большом внутри- и межвидовом разнообразии последовательностей ЦБП их объединяет наличие у предшественника сигнального пептида и обогащенного остатками цистеина (4–16) зрелого пептида. Несмотря на многочисленные исследования отдельных пептидов у отдельно взятых видов растений, оценка истинного числа, а также структурного и функционального разнообразия пептидов представляет значительные сложности. Однако быстрое развитие в последние годы методов полногеномного секвенирования и биоинформатики открывает новые возможности для проведения *in silico* поиска генов ЦБП в геномных и транскриптомных данных для последующих функциональных исследований.

Пырей удлиненный *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey – растение семейства мятликовые, которое растет повсеместно и является хорошим кормовым растением. Оно устойчиво к грибным заболеваниям, низким температурам, засоленности почвы, засухе; кроме того, этот вид обладает высокой урожайностью [14]. Устойчивость пырея к биотическим и абиотическим факторам среды делает его уникальным объектом для изучения механизмов формирования устойчивости к патогенам и абиотическим стрессовым факторам. Этот вид является также уникальным донором устойчивости при селекции пшеницы. В геноме пырея локализован целый ряд генов устойчивости к грибным болезням, обеспечивающих устойчивость к определенным расам патогенов [14]. В то же время гены АМП, обуславливающие устойчивость к широкому кругу патогенов, у пырея удлиненного не изучены. В литературе отсутствуют также данные о генах регуляторных пептидов, влияющих на устойчивость пырея к патогенам и абиотическому стрессу.

Цель настоящей работы – поиск *in silico* генов АМП и сигнальных пептидов в геноме пырея удлиненного *Th. elongatum*. В результате проведенного биоинформатического анализа в геноме пырея нами было выявлено 154 гена АМП-подобных и сигнальных пептидов. Дальнейшие исследования

экспрессии обнаруженных генов пептидов в ответ на стрессовые факторы среды, а также биологической активности пептидов *in vitro* позволят понять их роль в иммунной системе пырея для научно обоснованного использования этого вида в селекции пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа использовали последнюю версию сборки генома *Th. elongatum* isolate D-3458 (GenBank GCA_011799875.1). Поиск АМП и регуляторных пептидов проводили с использованием разработанного нами алгоритма, основанного на регулярных выражениях [15]. Для идентификации сигнальных пептидов использовали программу SignalP v6.0 [16]. Последовательности АМП, в которых не был найден сигнальный пептид, отбрасывали. Для всех найденных последовательностей предсказывали антимикробные свойства при помощи программы CAMPR4 [17]. Значение изоэлектрической точки (pI) определяли при помощи программы ProtParam [18]. Наличие С-концевого GPI (glycosylphosphatidylinositol) якоря предсказывали с помощью программы big-PI Plant Predictor [19]. Для аннотации пептидов использовали программу BLAST и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Все выравнивания последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Advance 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием разработанного нами ранее алгоритма у пырея было выявлено 154 гена АМП-подобных и сигнальных пептидов, связанных с защитными функциями. Обнаруженные гены кодируют пептиды следующих семейств: дефензины, снакины, липид-переносящие белки, тионины, гевеиноподобные пептиды, пептиды семейств Ole e 1, MEG и RALF. Кроме того, найдены гены, кодирующие пептиды с новым цистеиновым мотивом.

Дефензины/DEFLs

Дефензины представляют собой уникальное семейство АМП, поскольку они обнаружены у всех многоклеточных организмов [20]. В молекулах “классических” дефензинов восемь остатков цистеина, которые образуют следующий мотив: CX{4,25}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,17}CX{4,32}CXCX{1,6}C. К дефензиноподобным пептидам относят также пептиды со сходным 8-Цис-мотивом, который, однако, включает три расположенные подряд остатка цистеина в С-концевой области молекулы: CX{3,21}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,15}CX{4,23}CCC. К дефензиноподобным пептидам относятся также пептиды с шестью и четырьмя остатками

цистеина [13]. У 4-Цис DEFLs мотив следующий: CX{3,5}CX{8,17}CX{4,6}C.

Считается, что дефензины растений участвуют в защите от грибных и бактериальных патогенов и вредителей, используя для этого различные механизмы, такие как нарушение проницаемости мембран, ингибирование ионных каналов, а также подавление активности ферментов патогенов [20–23]. Помимо защиты от патогенов, дефензины обуславливают устойчивость к абиотическому стрессу [24, 25]. Кроме того, они участвуют в процессах развития [26].

В геноме пырея нами было обнаружено 39 генов предшественников дефензиноподобных пептидов (рис. 1, Приложение). Среди них 30 генов пептидов с классическим 8-Цис-мотивом (дефензины группы 1, DEFL1), два гена пептидов с 8-Цис-мотивом и расположенными подряд тремя остатками цистеина (дефензины группы 2, DEFL2), семь генов пептидов с 4-Цис-мотивом (дефензины группы 4, DEFL4). Во всех (кроме двух) генах классических дефензинов обнаружен интрон в области сигнального пептида. Предшественники DEFL1 имеют сходную структуру, характерную для дефензинов класса 1, которые секретируются в апопласт, и состоят из сигнального и зрелого пептидов. Лишь

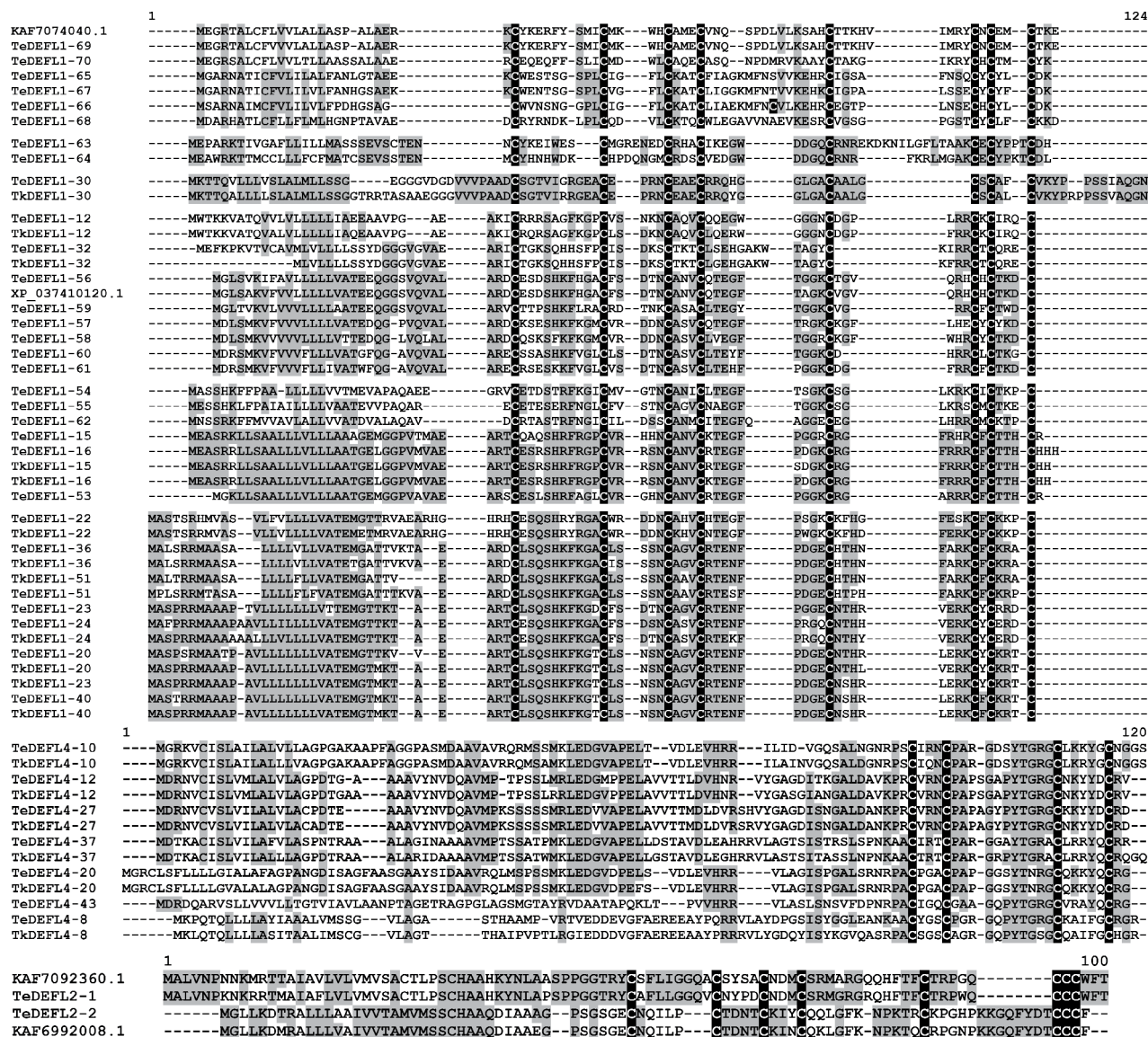


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей предшественников дефензинов DEFLs *Th. elongatum* (Te) и *T. kiharae* (Tk) [27], а также некоторых дефензинов растений. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Группы сходных пептидов разделены пустой строкой.

один предшественник TeDEFL1-30 содержит дополнительно короткий С-концевой домен (см. рис. 1). Значения рI большинства зрелых дефензинов варьируют от 7.73 до 10.06, но у восьми рI находится в диапазоне 5.02–6.86 (см. Приложение).

Гены классических дефензинов локализованы в шести из семи хромосом пырея. Число обнаруженных генов на разных хромосомах варьирует: на хромосоме 1Е – 10; 2Е – 3; 3Е – 6; 4Е – 5; 5Е – 4; 7Е – 2. На хромосоме 6Е генов предшественников дефензинов выявлено не было.

Все обнаруженные последовательности предшественников дефензинов пырея обладают наибольшим сходством с изученными нами ранее пептидами *Triticum kiharae* Dorof. et Migush., а также других растений родов *Triticum* и *Aegilops* (степень сходства $\geq 89\%$). Только у одного пептида TeDEFL1-59 гомология была ниже (81%). Единственным исключением стал пептид TeDEFL1-30, который обладал максимальным сходством с пептидом *Hordeum vulgare* L. (82%).

Сравнение последовательностей γ -коров дефензинов пырея – участков полипептидной цепи с мотивом GXCH_nC, которые связаны с антимикробными свойствами, с γ -корами дефензинов *T. kiharae* показало, что для ряда дефензинов они совпадают. Это относится к дефензинам пырея TeDEFL1-12, -16, -20, -32, -36 и -40. Проведенное нами ранее исследование показало, что эти γ -коры проявляют высокую антимикробную активность против дрожжеподобных грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*, различных видов фузариевых грибов и фитопатогенных бактерий – *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas savastanoi* и *Pectobacterium carotovorum* [28]. Причем оказалось, что наиболее высокой активностью и наиболее широким спектром антимикробного действия обладает γ -кор DEFL1-16, имеющий последовательность GKCRGFRRRC. У пырея, помимо TeDEFL1-16, есть еще два дефензина с очень сходными γ -корами: TeDEFL1-15 и TeDEFL1-53 (см. рис. 1). По сравнению с TeDEFL1-16 у TeDEFL1-15 в γ -коре K1 заменен на R1 и R8 заменен на H8; а у TeDEFL1-53 F6 заменен на A6. Поскольку все перечисленные выше замены являются консервативными, можно ожидать, что пептиды пырея TeDEFL1-15 и TeDEFL1-53 сохранят антимикробную активность, как у γ -кора TeDEFL1-16.

Два предшественника дефензинов с тремя подряд расположенными остатками цистеина TeDEFL2-1 и TeDEFL2-2 обладают наибольшим сходством последовательностей с гипотетическими белками *T. aestivum* KAF7092360.1 и KAF6992008.1: идентичность последовательностей составляла 85 и 91% для TeDEFL2-1 и TeDEFL2-2 соответственно (см. рис. 1, Приложение). Гены этих двух дефензинов расположены на хромосомах 6Е и 1Е.

Гены семи предшественников дефензиноподобных пептидов DEFL4, синтезирующихся в виде препробелков, расположены на хромосомах 2Е, 3Е и 6Е. Эти предшественники имеют высокое сходство с 4-Цис DEFL *T. kiharae* и гипотетическими белками растений родов *Triticum* и *Aegilops* (см. рис. 1, Приложение). Степень идентичности последовательностей варьирует от 82 до 97%.

Снакины

Снакины относятся к специфичным для растений цистеин-богатым АМП, содержащим 12 остатков цистеина, которые образуют следующий мотив: CX₃CX₃CX_{7,11}CX₃CX₂CCX₂CX_{1,3}CX₁₁CX_{1,2}CX_{11,14}-КСР. Накапливаются данные о том, что, как и другие АМП, снакины полифункциональны. Наряду с тем, что они эффективно подавляют рост патогенных бактерий и грибов [29], они участвуют в таких процессах, как деление, рост и элонгация клеток, цветение и др. [30, 31]. Как и гены дефензинов, гены снакинов образуют мультигенные семейства [32]. Их экспрессия регулируется биотическими и абиотическими стрессовыми факторами среды, а также гиббереллинами [33].

В геноме пырея нами найдено десять генов предшественников снакинов TeSN1–10 (рис. 2, а, Приложение). Известно, что гены снакинов обычно имеют один или два интрона [34]. Во всех генах снакинов пырея нами обнаружен интрон в области сигнального пептида. Второй интрон в области зрелого пептида был обнаружен в генах только двух снакинов (TeSN7 и TeSN9). Большинство генов снакинов пырея кодируют предшественники, которые состоят из сигнального пептида и зрелого цистеин-богатого пептида. Три предшественника состоят из трех доменов: сигнального пептида, вариабельного по аминокислотному составу участка, и зрелого пептида, содержащего 12 консервативно расположенных остатков цистеина (см. рис. 2, а). Такая трехдоменная структура предшественника описана и для других представителей этого семейства АМП [35]. У снакина TeSN5 обнаружена делеция в зрелом пептиде, приводящая к потере 5-го остатка цистеина.

Гены снакинов расположены во всех хромосомах пырея, кроме 3Е. Как и в случае дефензинов, число генов снакинов на разных хромосомах различно: в хромосомах 2Е и 5Е – по три гена, в остальных – по одному.

Зрелые пептиды снакинов являются основными молекулами. Как и дефензины, снакины пырея наиболее сходны со снакинами растений родов *Triticum* и *Aegilops* (см. рис. 2, а, Приложение). Процент идентичности аминокислотных последовательностей варьирует от 88 до 97%. Сравнение со снакином TksN1 пшеницы *T. kiharae* показало, что

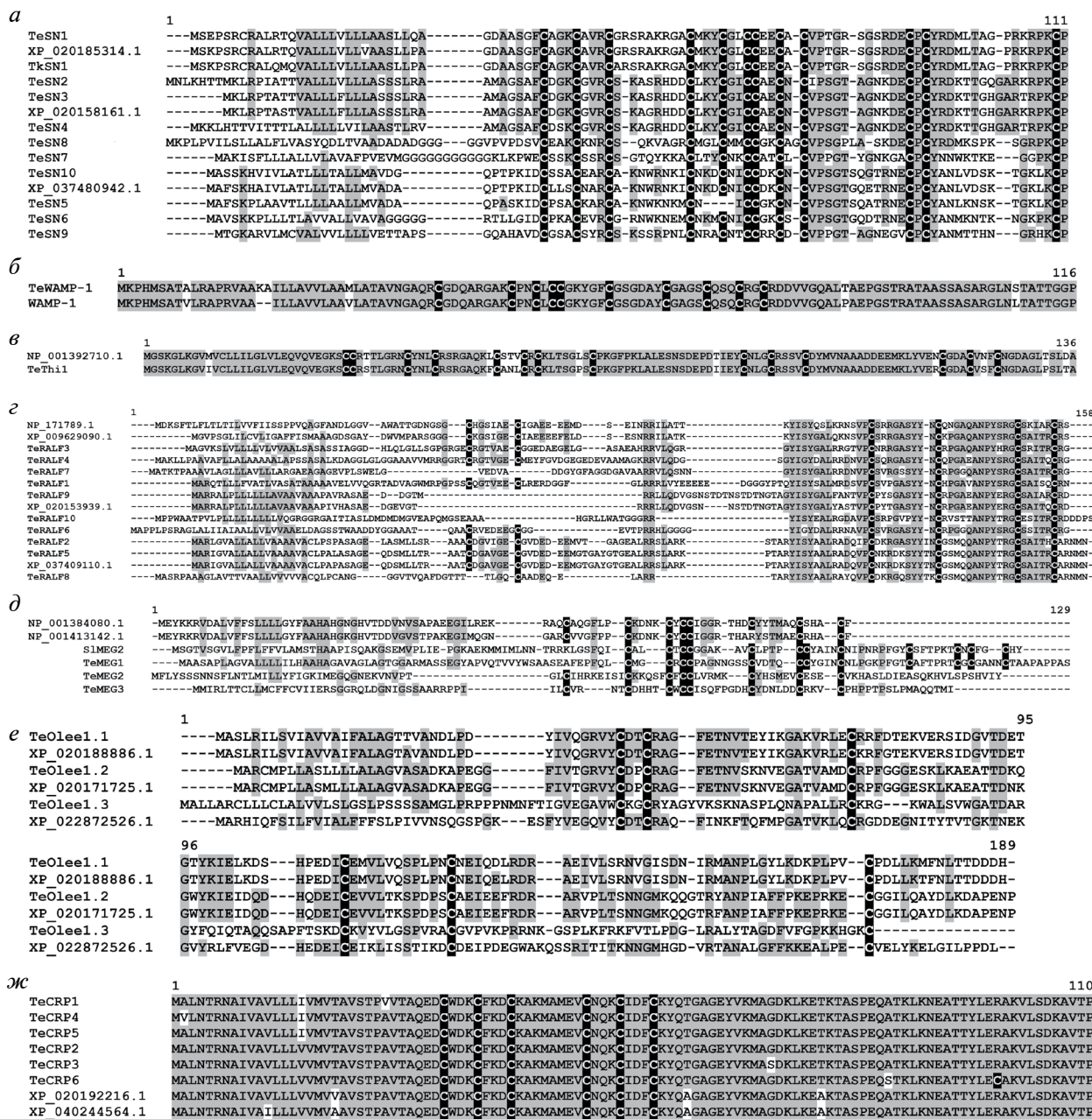


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей предшественников: *а* – снакинов *Th. elongatum*, TksN1 пшеницы [28] и некоторых снакинов растений рода *Triticum*; *б* – гевеиноподобного пептида *Th. elongatum* и пептида WAMP-1 пшеницы (P85966.2); *в* – тиониноподобного пептида *Th. elongatum* и гомологичной последовательности *T. aestivum*; *г* – пептидов семейства RALF *Th. elongatum* и других растений; *д* – пептидов семейства MEG *Th. elongatum*, пептида MEG2 *Solanum lycopersicum* [15] и пептидов MEG1 (NP_001384080.1), MEG2-like (NP_001413142.1) *Zea mays*; *е* – пептидов семейства Ole *e 1 Th. elongatum*, Ole *e 1*-like пептида *Olea europaea* var. *sylvestris* (XP_022872526.1) и гомологичных последовательностей; *ж* – цистеин-богатых пептидов *Th. elongatum* с новым мотивом и их ближайших гомологов. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Группы сходных пептидов разделены пустой строкой.

зрелый снакин TeSN1 отличается от снакина пшеницы лишь одной консервативной заменой аланина на глицин. Проведенное нами ранее изучение антимикробных свойств γ -курона пшеницы

выявило его высокую активность: IC₅₀ для различных грибных и бактериальных патогенов варьировало от 6 до 160 μ M [28]. Таким образом, можно предположить, что снакин пшеницы обладает такими

же антимикробными свойствами, как и пептид пшеницы. Сравнение последовательностей γ -коров других снакинов пырея с таковым TkSN1 выявило значительные различия, однако программа SAMPR4 указывает на наличие антимикробной активности у всех снакинов пырея.

Гевиноподобные пептиды

Гевиноподобные пептиды растений различаются по числу остатков цистеина в молекуле: описаны пептиды с шестью, восьмью и десятью остатками цистеина [36]. Для них характерно наличие хитин-связывающего сайта, состоящего из нескольких консервативно расположенных остатков гидрофобных аминокислот, который участвует во взаимодействии с хитином и другими полисахаридами клеточных стенок патогенов. Гевиноподобные пептиды обладают антифунгальными и антибактериальными свойствами, которые обусловлены ингибированием роста гиф грибов или клеточной стенки бактерий за счет непосредственного взаимодействия пептида с полимерами клеточных стенок патогена. Альтернативный механизм состоит в ингибировании эффекторов патогена, таких как металлопротеиназы грибов, которые гидролизуют защитные хитиназы растений [37]. Гевиноподобные пептиды синтезируются в виде препробелков. Некоторые представители семейства образуются в результате протеолитического процессинга хитиназ класса 1 или гололектинов [38, 39].

В геноме пырея нами найден один ген предшественника 10-Цис гевиноподобного пептида TeWAMP1 (см. Приложение). Ген расположен в хромосоме 2E. Предшественник TeWAMP1 имеет типичную трехдоменную структуру и состоит из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. По сравнению с предшественником гевиноподобного пептида пшеницы WAMP1 у TeWAMP1 есть отдельные замены и одна делеция в сигнальном пептиде и С-концевом продоме (см. рис. 2, б). Идентичность последовательности предшественника TeWAMP1 последовательности предшественника WAMP1 составляет 95%. Зрелый гевиноподобный пептид пырея TeWAMP1 полностью совпадает по аминокислотной последовательности с WAMP1 — гевиноподобным пептидом *T. kiharae*, обладающим антифунгальными и антибактериальными свойствами (см. рис. 2, б) [40]. Так, IC₅₀ ингибирования *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium solani* и *F. oxysporum* этим пептидом составляет 5 μ г/мл.

Тиониноподобные пептиды

Тионины представляют собой высокоосновные пептиды длиной 45–47 аминокислотных остатков с шестью или восьмью остатками цистеина, которые

образуют следующие мотивы: CCX^{10,11}CX^{8,10}CX^{5}CX^{7,10}C или CCX^{7}CX^{3}CX^{8-10}CX^{3}CXCX^{7}C [4, 13]. Тионины обнаружены только у растений. В соответствии с числом остатков цистеина в молекуле выделяют два основных структурных класса тионинов: тионины класса 1 с восьмью остатками цистеина и тионины класса 2 — с шестью остатками цистеина [41]. По сравнению с другими АМП тионины обладают очень высокой ингибирующей активностью в отношении как бактериальных, так и грибных патогенов, в ряде случаев сравнимой с активностью антибиотиков [42]. Тионины синтезируются в виде предшественников, которые состоят из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого кислого домена, который также обогащен остатками цистеина, расположение которых консервативно и описывается следующей формулой: CX^{3}CX^{3,4}CX^{4,32}CX^{2,3}CX^{3,4}C.

В генах предшественников тионинов выявлено два маленьких интрона в области С-концевого кислого домена [41].

Поиск последовательностей тионинов в данных секвенирования 1000 транскриптомов растений показал, что тионины значительно более распространены в растительном царстве, чем предполагалось ранее. Биоинформатический поиск позволил выявить 133 последовательности тиониноподобных пептидов у голосеменных и покрытосеменных растений, а также папоротников [41]. Тионины не были обнаружены у водорослей и мхов.

В геноме пырея обнаружен один ген предшественника тионина TeThi1, содержащий два интрона в области С-концевого домена (см. Приложение). Он расположен на хромосоме 1E. Как и предшественники тионинов других видов растений, TeThi1 имеет трехдоменную структуру и состоит из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Зрелый тионин содержит восемь консервативно расположенных остатков цистеина, а С-концевой домен, необходимый для транспорта пептида в вакуоль, — шесть (см. рис. 2, в). Сходство последовательностей предшественника TeThi1 с предшественником альфа-2-пуротионина пшеницы *T. aestivum* составляет 91%. В области зрелого пептида шесть замен, из которых три являются консервативными. Антимикробная активность альфа-2-пуротионина пшеницы *T. aestivum* высокая [43, 44], поэтому можно предположить, что и у тионина пырея она высокая, хотя это предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Неспецифические липид-переносящие белки

Неспецифические липид-переносящие белки (lipid-transfer proteins, LTPs) обнаружены у всех наземных растений [45]. Как и тионины, эти АМП выявлены исключительно у растений. Для LTPs характерен 8-Цис-мотив: CX^{6,15}CX^{9,31}CCX^{8,21}

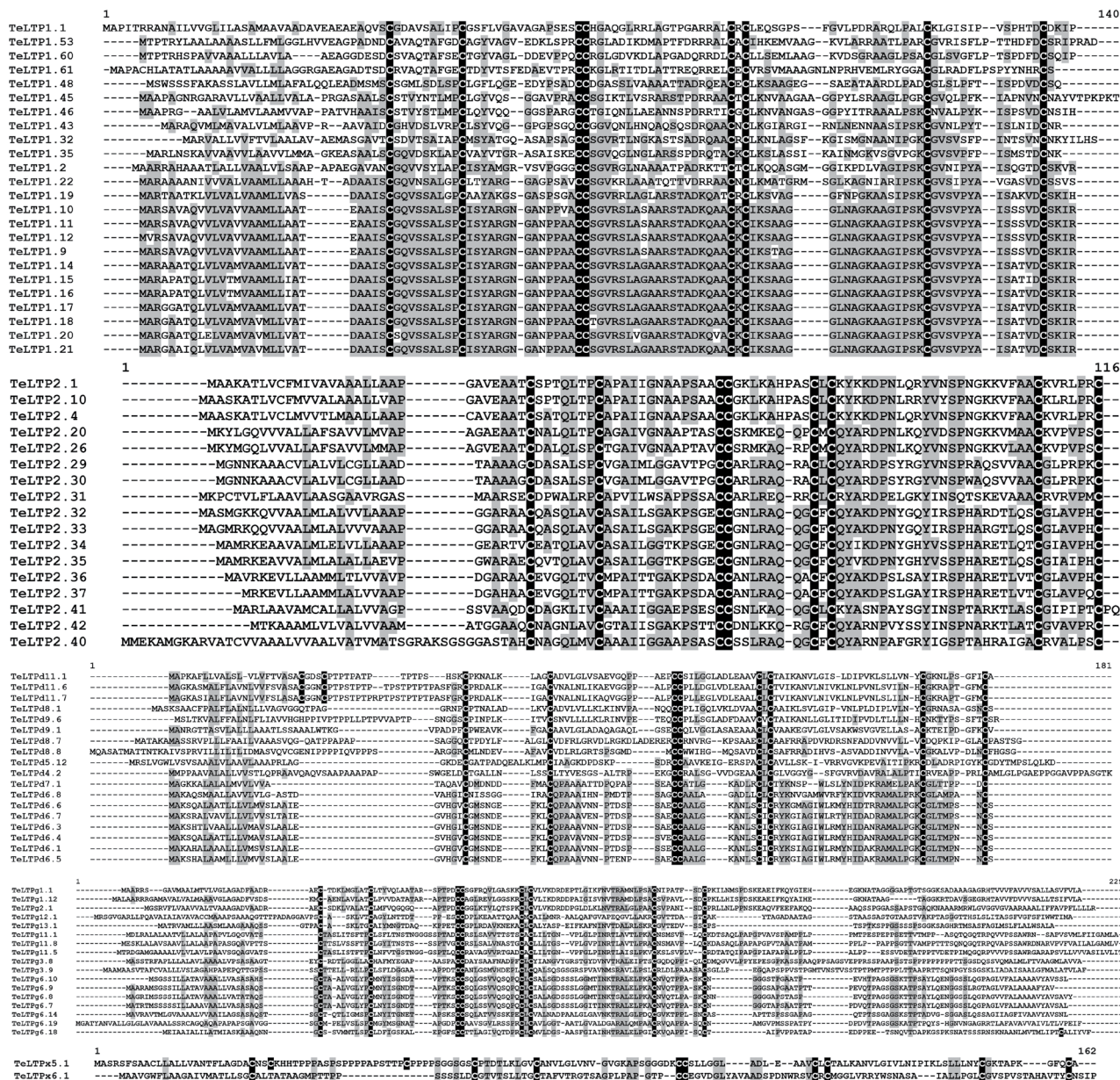


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей липид-переносящих белков *Th. elongatum*. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Типы сходных пептидов разделены пустой строкой.

СХСХ{13,35}СХ{5,18}С [46]. В молекулах LTP есть гидрофобная полость, за счет которой происходят связывание и перенос липидов. Существуют несколько типов классификаций LTPs: первая, подразделяющая LTPs на два семейства в зависимости от молекулярной массы (9 или 7 кДа), сменялась классификациями, учитывавшими расстояние между остатками цистеина, а также число и расположение интронов [45]. LTPs кодируются мультигенными семействами, насчитывающими десятки членов у одного вида, и синтезируются в виде предшественников, которые состоят из

сигнального и зрелого пептидов [47]. У некоторых LTPs в С-концевой области молекулы есть так называемый GPI-якорь. Недавние исследования выявили роль LTPs с GPI-якорем в защите от нехозяйских грибных патогенов и синтезе суберина, воска и спорополлена [48,49]. LTPs являются полифункциональными белками. Они участвуют в защите от биотического и абиотического стрессов, синтезе полимеров клеточной стенки, в развитии семян, прорастании, элонгации клеток и образовании клубеньков [45, 50–52].

В геноме пырея найдено 78 генов предшественников неспецифических липид-переносящих белков (рис. 3, Приложение). Как и у других видов покрытосеменных растений, у пырея это наиболее многочисленная группа цистеин-богатых пептидов. По разработанной нами ранее классификации LTPs пырея относятся к различным структурным типам: 1, 2, D, G и X [53]. Среди них есть полипептиды, содержащие GPI-якорь (тип G) и не содержащие его (типы 1, 2, D, X). Гены LTP расположены во всех хромосомах пырея. Однако распределены они по хромосомам неравномерно. Гены пептидов типа G расположены преимущественно на хромосоме 5E, большая часть генов LTP типа 1 – на 3E, типа 2 – на 1E и 4E, а типа D – на 2E. Гены LTP X расположены на хромосоме 4E. В девяти генах LTP, пять из которых относятся к генам LTP 1, обнаружен один интрон, в десяти генах – два интрона, причем все эти гены кодируют LTP G. Также в гене еще одного представителя этого типа *TeLTPg11.5* было найдено три интрона. Только гены LTP 2 не имели интронов. Большая часть LTPs пырея положительно заряжена (см. Приложение). Эти LTPs предположительно обладают антимикробными свойствами. Напротив, отрицательно заряженные LTPs, вероятнее всего, выступают в качестве сигнальных молекул, регулирующих иммунный ответ растения. Анализ с помощью программы SAMPR4 показал, что все LTPs, кроме трех пептидов, являются антимикробными (см. Приложение).

Пептиды семейства RALF

Пептиды семейства RALF (rapid alkalization factor) относятся к регуляторным цистеин-богатым пептидам. Они получили свое название благодаря их способности вызывать быстрое защелачивание среды в культуре клеток табака [54]. Пептиды RALF образуются из С-концевой области препробелка в результате протеолитического процессинга. Они участвуют в регуляции роста и развития, а также в передаче сигнала, регулирующего взаимодействия растение – патоген при патоген-индуцируемом иммунном ответе (PTI) [55, 56].

В геноме пырея выявлено 10 генов предшественников пептидов RALF (см. рис. 2, з, Приложение). У всех обнаружен сайт протеолитического расщепления RR, необходимый для образования зрелого пептида из С-концевой области предшественника. Гены предшественников RALF пырея находятся на хромосомах 1E, 2E, 3E, 4E и 5E. Все предшественники RALF пырея обладают высокой степенью сходства последовательностей (83–99%) с пептидами семейства RALF родственных видов родов *Triticum*, *Aegilops* и *Hordeum* (см. Приложение). Для всех пептидов RALF, кроме *TeRALF1*, предсказано наличие антимикробных свойств.

Пептиды семейства MEG

Гены семейства MEG (maternally expressed gene) обнаружены у многих видов злаков. Первый изученный у кукурузы ген *MEG1* экспрессируется в базальном слое транспортных клеток эндосперма и кодирует предшественник MEG1, который состоит из сигнального пептида и зрелого пептида. Зрелый пептид содержит восемь остатков цистеина, образующих следующий мотив: CX_{4,9}CX_{4,12}CXCCX_{4,10}CX_{6,12}CX_{3}C [57]. Роль пептидов семейства MEG изучена слабо. Предполагают, что они могут выступать как структурные, защитные или транспортные белки.

В геноме пырея найдено три гена предшественников пептидов MEG, которые по цистеиновому мотиву сходны с пептидами семейства MEG кукурузы MEG1 и MEG2-like (см. рис. 2, д, Приложение). Гены предшественников MEG пырея находятся на хромосомах 2E, 5E и 6E. Все они обладают наибольшим сходством последовательностей с неохарактеризованными белками родственных видов родов *Triticum* и *Aegilops*. Степень идентичности последовательностей составляет 62–96%. У двух пептидов *TeMEG1* и *TeMEG2* предсказано наличие антимикробных свойств (см. Приложение).

Пептиды семейства Ole e 1

Пептиды семейства Ole e 1 являются основными аллергенами пыльцы оливы *O. europaea* [58]. На долю Ole e 1 может приходиться до 20% от общего белка пыльцы [59]. Этот низкомолекулярный белок содержит шесть консервативно расположенных остатков цистеина и обладает сходством последовательности с белками пыльцы других видов растений, таких как кукуруза, рис, береза и арабидопсис. Роль этих полипептидов неизвестна. Полагают, что они участвуют в процессах роста пыльцевой трубки [60].

В геноме пырея найдено три гена предшественников полипептидов Ole e 1, по одному в хромосомах 1E, 2E и 3E (см. рис. 2, е, Приложение). Во всех генах Ole e 1 пырея обнаружен интрон в области зрелого пептида. Полипептиды пырея обладают максимальным сходством с белками семейства Ole e 1 *Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* (98–99%). Два пептида из трех являются кислыми, а один высокоосновным, при этом антимикробная активность предсказана для всех пептидов Ole e 1 (см. Приложение).

Цистеин-богатые пептиды с новым мотивом

В геноме пырея найдено девять генов предшественников пептидов *TeCRP1–6* с новым цистеиновым мотивом: CX_{3}CX_{3}CX_{8}CX_{3}CX_{3}C (см. рис. 2, ж, Приложение). Они высоко гомологичны, отличаясь единичными аминокислотными

заменами. Кроме того, было обнаружено, что четыре гена кодируют идентичный по аминокислотной последовательности продукт — TeCRP2. Гены *TeCRP1–6* локализованы в хромосоме 5E. Кодируемые ими слабощелочные пептиды имеют максимальное сходство с неохарактеризованными белками *Ae. tauschii* (см. Приложение). Антимикробные свойства у этих пептидов, по всей видимости, отсутствуют. Функции этих пептидов остаются неизвестными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пырей *Th. elongatum* — дикорастущий злак, который обладает высокой устойчивостью к патогенам и абиотическому стрессу. Механизмы устойчивости пырея к разным видам стресса слабо изучены. В литературе имеются данные о генах устойчивости пырея, “узнающих” факторы вирулентности патогенов и обеспечивающих расоспецифическую устойчивость по типу ETI. Так, было установлено, что длинное плечо хромосомы 7 (7EL) *Th. elongatum* несет участок с локусом высокоэффективной устойчивости к фузариозу колоса (*fusarium head blight*, FHB) [61, 62], в нем также находятся локусы устойчивости к листовой (Lr19 и Lr29) и стеблевой (Sr25 и Sr43) ржавчине [63, 64]. Всего в геноме *Th. elongatum* было аннотировано 1897 аналогов генов устойчивости [14]. Помимо устойчивости к патогенам, *Th. elongatum* является также источником устойчивости к абиотическим стрессовым факторам среды, таким как низкие температуры, переувлажнение и засоление почв. В частности, было показано, что в хромосоме 2E расположены локусы устойчивости к переувлажнению, а в хромосоме 3E — локусы солеустойчивости.

В отличие от ETI факторы устойчивости, связанные с PTI, такие как защитные белки и пептиды, у пырея не изучены. Цель настоящей работы состояла в поиске *in silico* всего комплекса генов защитных пептидов в геноме диплоидного вида пырея *Th. elongatum*, который несет базовый для этого рода геном E ($2n = 2x = 14$, EE) [65]. Выявление всего пула генов защитных пептидов у пырея представляло интерес, с одной стороны, для характеристики молекулярных компонентов иммунной системы у этого вида, что послужит базой для дальнейшего исследования механизмов устойчивости. С другой стороны, эти исследования необходимы для научно обоснованного практического использования *Th. elongatum* в качестве донора устойчивости в селекции пшеницы, что приобретает в последнее время особую актуальность. На фоне быстрого роста населения земного шара необходимо увеличение производства пшеницы. Это увеличение может быть достигнуто в основном за счет повышения урожайности с помощью интегрированных методов борьбы с болезнями и вредителями и повышения устойчивости к абиотическим

стрессам. Ежегодно около 20% урожая пшеницы теряется из-за болезней [66]. Абиотический стресс, вызванный засухой, засоленностью почвы и загрязнением тяжелыми металлами, также существенно снижает продуктивность этой важнейшей сельскохозяйственной культуры.

Для поиска генов антимикробных и сигнальных пептидов в геноме пырея мы использовали разработанный ранее алгоритм поиска по цистеиновым мотивам, характерным для различных семейств цистеин-богатых пептидов [15].

В результате в геноме пырея нами выявлено 154 гена антимикробных и сигнальных пептидов (см. Приложение). Следует отметить, что число генов пептидов различных семейств видоспецифично и различается у разных видов растений [13]. Обнаруженные нами в геноме пырея гены кодируют пептиды следующих семейств: дефензины, LTPs, снакины, гевеиноподобные пептиды, тионины, пептиды семейств MEG, Ole e 1 и RALF. Обнаружено также новое семейство генов пептидов CRP с ранее неизвестным 6-Цис-мотивом, функции которых еще предстоит изучить. Поиск сходных последовательностей с помощью программ BLAST показал, что пептиды пырея обладают максимальным сходством с пептидами растений семейства мятликовые, прежде всего относящихся к родам *Triticum* и *Aegilops* (см. Приложение). Этот результат согласуется с цитогенетическими данными о наибольшем из всех злаков сходстве генома E пырея с геномом D *Ae. tauschii* [67, 68].

Самое многочисленное семейство генов пептидов у пырея представлено генами LTP (78). Следующим по численности семейством оказались дефензины (39). Эти данные согласуются с литературными данными о численном преобладании генов LTP и дефензинов в геномах растений [13, 53, 69, 70].

Гены антимикробных и сигнальных пептидов обнаружены во всех семи хромосомах пырея (рис. 4). Однако обогащенность генами пептидов для разных хромосом пырея различается. Больше всего генов пептидов выявлено в хромосоме 5E (34), а меньше всего — в хромосоме 6E (7) (рис. 5). Гены пептидов распределены по хромосомам неравномерно, встречаются обогащенные и бедные генами пептидов участки (см. рис. 4 и 5). Для многих хромосом пырея генами пептидов обогащены области, примыкающие к теломерным районам. Гены пептидов отдельных семейств также распределены по хромосомам неравномерно (см. рис. 5). Гены DEFL и LTP находятся на всех хромосомах. Напротив, гены цистеин-богатых пептидов CRP с новым мотивом локализованы только на хромосоме 5E. Гены снакинов не обнаружены в хромосоме 3E. Гены RALFs не найдены в хромосомах 6E и 7E.

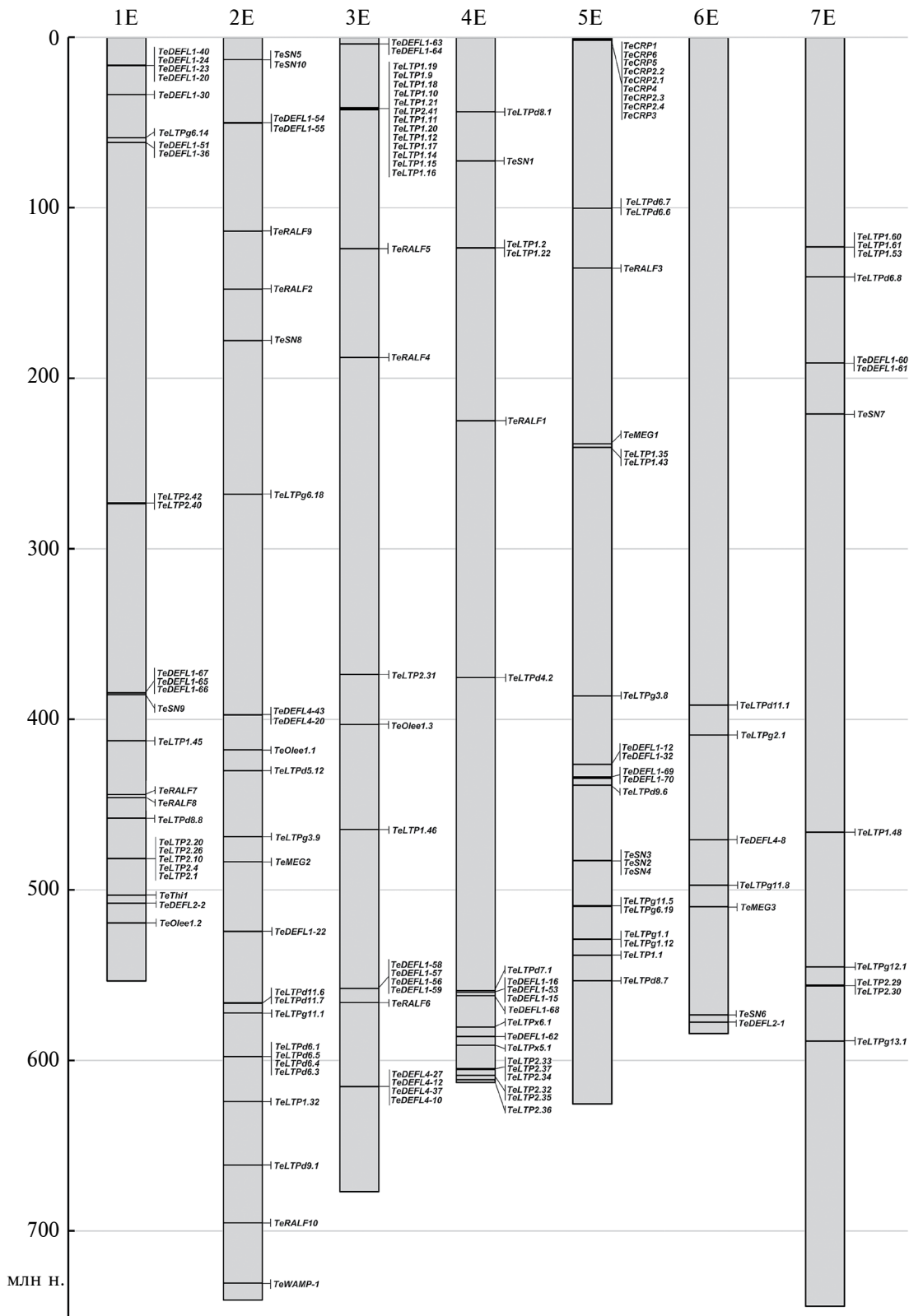


Рис. 4. Карта расположения генов АМП и сигнальных пептидов на хромосомах *Th. elongatum*.

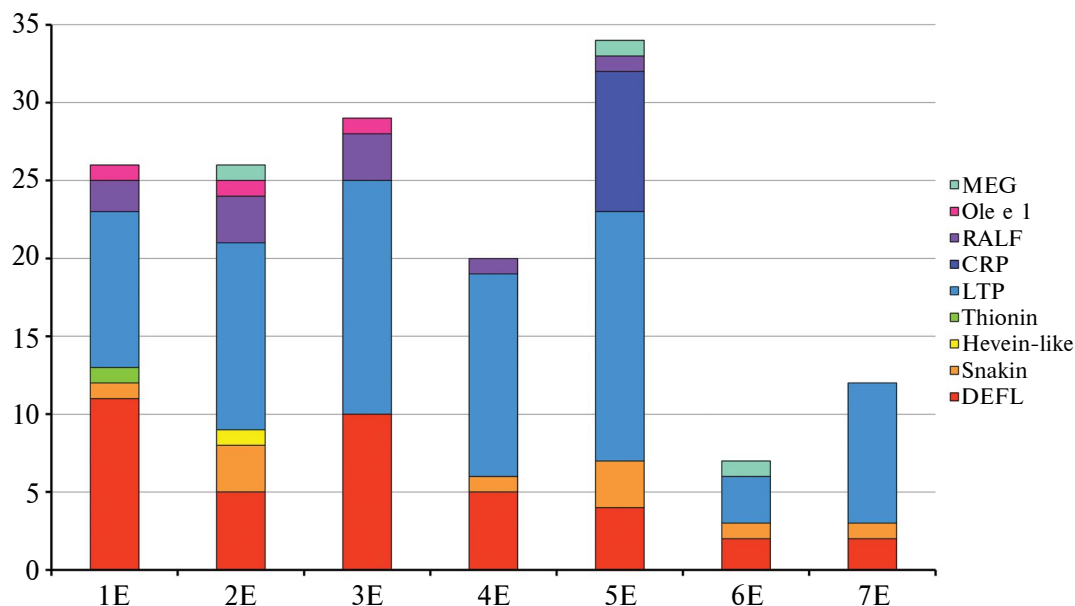


Рис. 5. Распределение генов АМР и сигнальных пептидов по хромосомам пырея. Snakin – снакин, Hevein-like – гевеиноподобный пептид, Thionin – тионин.

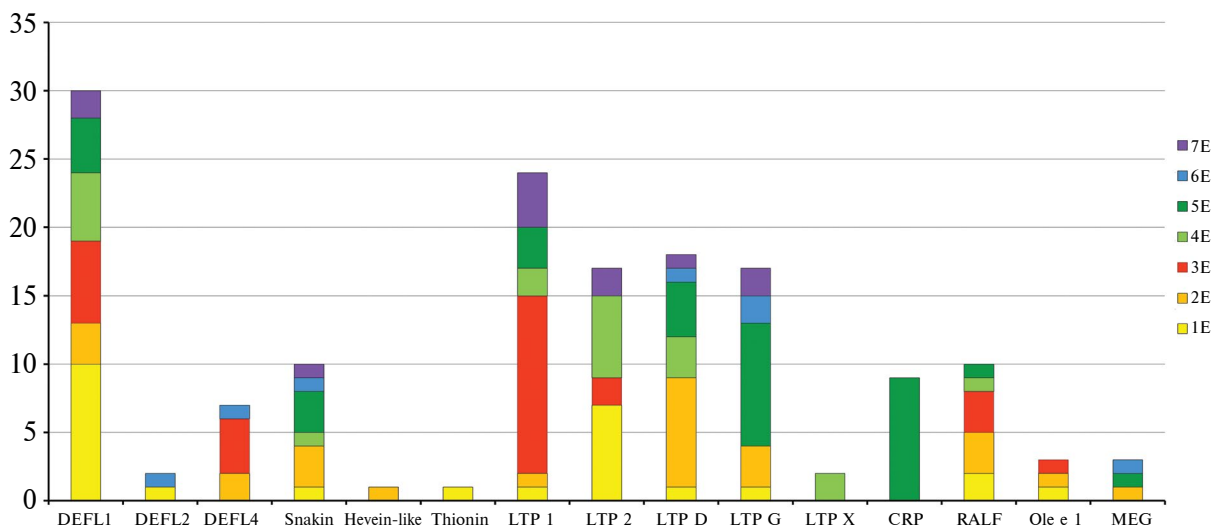


Рис. 6. Представленность генов пептидов разных подгрупп в хромосомах пырея. Snakin – снакин, Hevein-like – гевеиноподобный пептид, Thionin – тионин.

Интересно распределение по хромосомам пырея генов различных подсемейств пептидов (рис. 6). Так, гены “классических” дефензинов расположены на всех хромосомах, кроме 6Е. Гены дефензинов с 4-Цис-мотивом находятся только на трех хромосомах 2Е, 3Е и 6Е. Подавляющее число генов LTP 1 находится на хромосоме 3Е; гены LTP 2, за единичными исключениями, – на хромосомах 1Е и 4Е; гены LTP D – на хромосомах 2Е, 4Е, 5Е;

гены типа LTP G – преимущественно на хромосоме 5Е. В ряде случаев гены пептидов одного семейства образуют кластеры, кодирующие сходные по последовательности пептиды, что свидетельствует о том, что они возникли в результате тандемных дупликаций (см. рис. 4). К таким кластерам относятся, например, кластер генов дефензинов, кодирующих TeDEFL1-20, -23, 24, -40, на хромосоме 1Е (см. рис. 1 и 4); кластер генов LTP 1 на хромосоме

3E, кластер генов LTP D подтип 6 на хромосоме 2E (см. рис. 3 и 4). Гены снакинов, кодирующие близкородственные пептиды TeSN2, 3 и 4, а также гены цистеин-богатых пептидов CRP с новым мотивом образуют отдельные кластеры на хромосоме 5E (см. рис. 2 и 4).

Таким образом, в геноме диплоидного вида *Th. elongatum* нами выявлено 154 новых гена цистеин-богатых пептидов, относящихся к девяти семействам. Изучена локализация генов пептидов в хромосомах пырея. Дальнейшие исследования биологической активности обнаруженных пептидов с использованием трансгенных технологий и тестирования *in vitro* позволят понять их роль в защите от стресса, а также в других физиологических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-16-00010 (М.П. Слезина, Е.А. Истомина, Т.И. Одинцова) и государственного задания № 122022600163-7 (А.Н. Шиян).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dodds P., Rathjen J.* Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
2. *Zou F., Tan C., Shinali T.S. et al.* Plant antimicrobial peptides: A comprehensive review of their classification, production, mode of action, functions, applications, and challenges // *Food Funct.* 2023. V. 14. № 12. P. 5492–5515. doi: 10.1039/d3fo01119d
3. *Li J., Hu S., Jian W. et al.* Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications // *Bot. Stud.* 2021. V. 62. № 1. 5. doi: 10.1186/s40529-021-00312-x
4. *Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L.* Antimicrobial peptides from plants // *Pharmaceuticals.* 2015. V. 8. № 4. P. 711–757. doi: 10.3390/ph8040711
5. *Bolouri Moghaddam M.R., Vilcinskas A., Rahnamaeian M.* Cooperative interaction of antimicrobial peptides with the interrelated immune pathways in plants // *Mol. Plant Pathol.* 2016. V. 17. № 3. P. 464–471. doi: 10.1111/mpp.12299
6. *Campos M.L., de Souza C.M., de Oliveira K.B.S. et al.* The role of antimicrobial peptides in plant immunity // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 21. P. 4997–5011. doi: 10.1093/jxb/ery294
7. *Hu Z., Zhang H., Shi K.* Plant peptides in plant defense responses // *Plant Signal. Behav.* 2018. V. 13. № 8. doi: 10.1080/15592324.2018.1475175
8. *Xie H., Zhao W., Li W. et al.* Small signaling peptides mediate plant adaptations to abiotic environmental stress // *Planta.* 2022. V. 255. № 4. 72. doi: 10.1007/s00425-022-03859-6
9. *Marmiroli N., Maestri E.* Plant peptides in defense and signaling // *Peptides.* 2014. V. 56. P. 30–44. doi: 10.1016/j.peptides.2014.03.013
10. *Yamaguchi K., Kawasaki T.* Pathogen- and plant-derived peptides trigger plant immunity // *Peptides.* 2021. V. 144. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170611
11. *Tavormina P., De Coninck B., Nikonorova N. et al.* The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions // *Plant Cell.* 2015. V. 27. № 8. P. 2095–2118. doi: 10.1105/tpc.15.00440
12. *Silverstein K.A., Graham M.A., Paape T.D. et al.* Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. № 2. P. 600–610. doi: 10.1104/pp.105.060079
13. *Silverstein K.A., Moskal W.A. Jr., et al.* Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants // *Plant J.* 2007. V. 51. № 2. P. 262–280. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x
14. *Коростылева Т.В., Шиян А.Н., Одинцова Т.И.* Генетический ресурс пырея *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey в селекционном улучшении пшеницы // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 10. С. 1112–1119. doi: 10.31857/S0016675823100077
15. *Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V. et al.* Molecular insights into the role of cysteine-rich peptides in induced resistance to *Fusarium oxysporum* infection in tomato based on transcriptome profiling // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 11. doi: 10.3390/ijms22115741.
16. *Teufel F., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R. et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. P. 1023–1025. doi: 10.1038/s41587-021-01156-3
17. *Gawde U., Chakraborty S., Waghu F.H. et al.* CAMPR4: A database of natural and synthetic antimicrobial peptides // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. P. D377–D383. doi: 10.1093/nar/gkac933.
18. *Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server // *The Proteomics Protocols Handbook* / Ed. John M. Walker. USA: Humana Press, 2005. P. 571–607.
19. *Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C.J. et al.* Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for *Arabidopsis* and rice // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 1691–1701. doi: 10.1104/pp.103.023580.
20. *Parisi K., Shafee T.M.A., Quimbar P. et al.* The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 88. P. 107–118. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004

21. *Lay F.T., Anderson M.A.* Defensins – components of the innate immune system in plants // *Curr. Protein and Pept. Sci.* 2005. V. 6. № 1. P. 85–101. doi: 10.2174/1389203053027575.
22. *Cools T.L., Struyfs C., Cammue B.P., Thevissen K.* Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections // *Future Microbiol.* 2017. V. 12. P. 441–454. doi: 10.2217/fmb-2016-0181
23. *Sathoff A.E., Samac D.A.* Antibacterial activity of plant defensins // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2019. V. 32. № 5. P. 507–514. doi: 10.1094/MPMI-08-18-0229-CR
24. *Mirouze M., Sels J., Richard O. et al.* A putative novel role for plant defensins: A defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance // *Plant J.* 2006. V. 47. № 3. P. 329–342. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x
25. *Sasaki K., Kuwabara C., Umeki N. et al.* The cold-induced defensin TAD1 confers resistance against snow mold and *Fusarium* head blight in transgenic wheat // *J. Biotechnol.* 2016. V. 228. P. 3–7. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.015
26. *Stotz H.U., Spence B., Wang Y.* A defensin from tomato with dual function in defense and development // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 71. № 1–2. P. 131–143. doi: 10.1007/s11103-009-9512-z
27. *Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. et al.* Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: A focus on structural diversity and role in induced resistance // *PeerJ.* 2019. V. 7. doi: 10.7717/peerj.6125
28. *Slezina M.P., Istomina E.A., Kulakovskaya E.V. et al.* The γ -core motif peptides of AMPs from grasses display inhibitory activity against human and plant pathogens // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 15. doi: 10.3390/ijms23158383
29. *Segura A., Moreno M., Madueño F. et al.* Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 1. P. 16–23. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.1.16
30. *Nahirñak V., Almasia N.I., Fernandez P.V. et al.* Potato snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell wall composition // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. № 1. P. 252–263. doi: 10.1104/pp.111.186544
31. *Zhang S., Yang C., Peng J. et al.* *GAS5*, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 745–759. doi: 10.1007/s11103-009-9452-7
32. *Oliveira-Lima M., Benko-Iseppon A.M., Neto J.R.C.F. et al.* Snakin: Structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2017. V. 18. № 4. P. 368–374. doi: 10.2174/1389203717666160619183140
33. *Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M. et al.* Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. № 3. P. 951–961. doi: 10.1104/pp.010685
34. *Meiyalaghan S., Thomson S.J., Fiers M.W. et al.* Structure and expression of *GSL1* and *GSL2* genes encoding gibberellin stimulated-like proteins in diploid and highly heterozygous tetraploid potato reveals their highly conserved and essential status // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. 2. doi: 10.1186/1471-2164-15-2
35. *Iqbal A., Khan R.S.* Snakins: Antimicrobial potential and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants // *Mol. Biol. Rep.* 2023. V. 50. № 10. P. 8683–8690. doi: 10.1007/s11033-023-08734-5
36. *Slavokhotova A.A., Shelenkov A.A., Andreev Y.A., Odintsova T.I.* Hevein-like antimicrobial peptides of plants // *Biochemistry (Mosc).* 2017. V. 82. № 13. P. 1659–1674. doi: 10.1134/S0006297917130065
37. *Slavokhotova A.A., Naumann T.A., Price N.P. et al.* Novel mode of action of plant defense peptides – hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases // *FEBS J.* 2014. V. 281. № 20. P. 4754–4764. doi: 10.1111/febs.13015
38. *Van den Bergh K.P., Rougé P., Proost P. et al.* Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) // *Planta.* 2004. V. 219. № 2. P. 221–232. doi: 10.1007/s00425-004-1238-1
39. *Loo S., Tay S.V., Kam A. et al.* Anti-fungal hevein-like peptides biosynthesized from quinoa cleavable hololectins // *Molecules.* 2021. V. 26. № 19. doi: 10.3390/molecules26195909
40. *Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. et al.* A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 15. P. 4266–4275. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07135.x
41. *Höng K., Austerlitz T., Bohlmann T., Bohlmann H.* The thionin family of antimicrobial peptides // *PLoS One.* 2021. V. 16. № 7. doi: 10.1371/journal.pone.0254549
42. *Oard S., Rush M.C., Oard J.H.* Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani* // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 97. № 1. P. 169–180. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x
43. *Molina A., Ahl Goy P., Fraile A. et al.* Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II // *Plant Science.* 1993. V. 92. № 2. P. 169–177. doi: 10.1016/0168-9452(93)90203-C
44. *Terras F., Schoofs H., Thevissen K. et al.* Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors // *Plant Physiol.* 1993. V. 103. № 4. P. 1311–1319. doi: 10.1104/pp.103.4.1311

45. *Salminen T.A., Blomqvist K., Edqvist J.* Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function // *Planta*. 2016. V. 244. № 5. P. 971–997. doi: 10.1007/s00425-016-2585-4
46. *Kader J.C.* Lipid-transfer proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 627–654. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627
47. *Santos-Silva C.A.D., Ferreira-Neto J.R.C., Amador V.C. et al.* From gene to transcript and peptide: A deep overview on non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) // *Antibiotics (Basel)*. 2023. V. 12. № 5. 939. doi: 10.3390/antibiotics12050939
48. *Fahlberg P., Buhot N., Johansson O.N., Andersson M.X.* Involvement of lipid transfer proteins in resistance against a non-host powdery mildew in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20. № 1. P. 69–77. doi: 10.1111/mpp.12740
49. *Edstam M.M., Blomqvist K., Eklöf A. et al.* Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 83. № 6. P. 625–649. doi: 10.1007/s11103-013-0113-5
50. *Yang Y., Li P., Liu C. et al.* Systematic analysis of the non-specific lipid transfer protein gene family in *Nicotiana tabacum* reveal its potential roles in stress responses // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 172. P. 33–47. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.01.002
51. *Liu F., Zhang X., Lu C. et al.* Non-specific lipid transfer proteins in plants: Presenting new advances and an integrated functional analysis // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 19. P. 5663–5681. doi: 10.1093/jxb/erv313
52. *Missaoui K., Gonzalez-Klein Z., Pazos-Castro D. et al.* Plant non-specific lipid transfer proteins: An overview // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 171. P. 115–127. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.12.026
53. *Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. et al.* Non-specific lipid transfer proteins in *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: Identification, characterization and expression profiling in response to pathogens and resistance inducers // *Pathogens*. 2019. V. 8. № 4. 221. doi: 10.3390/pathogens8040221
54. *Pearce G., Moura D.S., Stratmann J., Ryan C.A. Jr.* RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 22. P. 12843–12847. doi: 10.1073/pnas.201416998
55. *Blackburn M.R., Haruta M., Moura D.S.* Twenty years of progress in physiological and biochemical investigation of RALF peptides // *Plant Physiol.* 2020. V. 182. № 4. P. 1657–1666. doi: 10.1104/pp.19.01310
56. *Stegmann M., Monaghan J., Smakowska-Luzan E. et al.* The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling // *Science*. 2017. V. 355. № 6322. P. 287–289. doi: 10.1126/science.aal2541
57. *Gutiérrez-Marcos J.F., Costa L.M., Biderre-Petit C. et al.* Maternally expressed gene1 Is a novel maize endosperm transfer cell-specific gene with a maternal parent-of-origin pattern of expression // *Plant Cell*. 2004. V. 16. № 5. P. 1288–1301. doi: 10.1105/tpc.019778
58. *Villalba M., Batanero E., López-Otín C. et al.* The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. № 3. P. 863–869. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18208.x
59. *Castro A.J., de Dios Alché J., Cuevas J. et al.* Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1 // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003. V. 131. № 3. P. 164–173. doi: 10.1159/000071482
60. *De Dios Alché J., M'rani-Alaoui M., Castro A.J., Rodríguez-García M.I.* Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during *in vitro* germination // *Plant Cell. Physiol.* 2004. V. 45. № 9. P. 1149–1157. doi: 10.1093/pcp/pch127
61. *Han F.P., Fedak G.* Molecular characterization of partial amphiploids from *Triticum durum* × tetraploid *Thinopyrum elongatum* as novel source of resistance to wheat *Fusarium* head blight // *Proc. 10th Int. Wheat Genet. Symp. Paestum*. 2003. P. 1148–1150.
62. *Miller S.S., Watson E.M., Lazebnik J. et al.* Characterization of an alien source of resistance to *Fusarium* head blight transferred to Chinese spring wheat // *Botany*. 2011. V. 89. P. 301–311. doi: 10.1139/b11-017
63. *Ceoloni C., Forte P., Kuzmanović L. et al.* Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to *Fusarium* head blight and crown rot of wheat on *Thinopyrum elongatum* 7EL and its pyramiding with valuable genes from a *Th. ponticum* homoeologous arm onto bread wheat 7DL // *Theor. Appl. Genet.* 2017. V. 130. P. 2005–2024. doi: 10.1007/s00122-017-2939-8
64. *Konkin D., Hsueh Y.C., Kirzinger M. et al.* Genomic sequencing of *Thinopyrum elongatum* chromosome arm 7EL, carrying fusarium head blight resistance, and characterization of its impact on the transcriptome of the introgressed line CS-7EL // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. 228. doi: 10.1186/s12864-022-08433-8
65. *Wang R.R., Larson S.R., Jensen K.B. et al.* Genome evolution of intermediate wheatgrass as revealed by EST-SSR markers developed from its three progenitor diploid species // *Genome*. 2015. V. 58. № 2. P. 63–70. doi: 10.1139/gen-2014-0186
66. *Singh J., Chhabra B., Raza A. et al.* Important wheat diseases in the US and their management in the 21st century // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1010191
67. *Liu Z., Li D., Zhang X.* Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in Triticeae

- revealed by genomic southern and *in situ* hybridization // J. Integr. Plant Biol. 2007. V. 49. № 7. P. 1080–1086. doi: 10.1111/j.1672-9072.2007.00462.x
68. Gaál E., Valárik M., Molnár I. et al. Identification of COS markers for *Thinopyrum elongatum* chromosomes preliminary revealed high level of macrosyntenic relationship between the wheat and *Th. elongatum* genomes // PLoS One. 2018. V. 13. № 12. doi: 10.1371/journal.pone.0208840.
69. Ke T., Cao H., Huang J. et al. EST-based *in silico* identification and *in vitro* test of antimicrobial peptides in *Brassica napus* // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. 653. doi: 10.1186/s12864-015-1849-x
70. Tian D., Xie Q., Deng Z. et al. Small secreted peptides encoded on the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome and their potential roles in stress responses // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1000297

Cysteine-Rich Peptide Genes of Wheatgrass *Thinopyrum elongatum*

M. P. Slezina^a, E. A. Istomina^a, A. N. Shiyan^a, T. I. Odintsova^{a, *}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Cysteine-rich peptides play an important role in the plant defense system. The aim of the present work was to search *in silico* for genes encoding antimicrobial and signaling peptides in the genome of *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey ($2n = 14, EE$) – a wild grass species with high resistance to pathogens and abiotic stress. Bioinformatic analysis revealed 154 new genes of antimicrobial and signaling peptide precursors belonging to 9 families in *Th. elongatum* genome. Introns were detected in a number of cysteine-rich peptide genes. The structure of peptide precursors and localization of peptide genes in wheat chromosomes were determined. The greatest similarity of the sequences of *Th. elongatum* peptides with homologous peptides of plants of the genera *Triticum* and *Aegilops* was shown, which confirms the cytogenetic data on the relatedness of genome E with genome D and similar genomes. The results obtained contribute to the characterization of molecular components of the immune system of *Th. elongatum* and will serve as a basis for further studies of resistance mechanisms, as well as for scientifically justified practical use of this species as a resistance donor in wheat breeding.

Keywords: plant immunity, *Thinopyrum elongatum*, cysteine-rich peptides, gene biodiversity.